

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Kultury léčivých rostlin *in vitro* - XVIII.

Iva Bremertová

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Oponent: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Počet stran: 74

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucí práce paní doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za odborné vedení a rady, dále panu PharmDr. Janu Martinovi, Ph.D. za pomoc se zpracováním vzorků metodou HPLC. Také bych chtěla poděkovat svému příteli a rodině za podporu během celého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Obsah

1. ABSTRAKT.....	6
Abstract.....	7
ÚVOD.....	8
2. CÍL PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1 <i>Genista tinctoria</i> – Kručinka barvířská.....	10
3.1.1 Popis.....	10
3.1.2 Výskyt.....	12
3.1.3 Obsahové látky.....	13
3.1.4 Účinky rostliny a její terapeutické využití.....	15
3.2 Explantátové kultury rostlin.....	17
3.2.1 Využití explantátových kultur.....	20
3.2.2 Rozdělení explantátových kultur dle kultivovaného explantátu: ²⁴	21
3.2.3 Složení kultivačního média ²¹	22
3.3 Metoda elicitace ²⁹	28
3.3.1 Ethephon.....	29
3.3.2 Ethephon a výzkum.....	30
3.3.3 Inhibice stříbrnými ionty.....	32
Experimentální část.....	33
3.4 Laboratorní pomůcky a technické vybavení.....	33
3.5 Chemikálie.....	34
3.6 Kultivace tkáňových kultur.....	35
3.6.1 Rostlinný materiál.....	35
3.6.2 Příprava kultivačních nádob a nástrojů.....	35
3.6.3 Živné médium- SH.....	36
3.6.4 Pasážování a kultivace.....	37
3.7 Příprava elicitoru.....	38
3.8 Příprava inhibitoru.....	38
3.9 Elicitace.....	39

3.9.1	Provedení odběrů vzorků u kalusových kultur:	39
3.9.2	Provedení odběrů vzorků u suspenzních kultur:	40
3.10	Stanovení obsahu izoflavonoidů	40
3.10.1	Úprava usušených vzorků z kalusových a suspenzních kultur	40
3.10.2	Úprava vzorků s živnými médii	41
3.10.3	HPLC analýza.....	41
3.11	Kalibrační křivky.....	42
3.12	Chromatogram standardů izoflavonoidů.....	45
3.13	Statistické zpracování dat ^{47, 48}	46
3.13.1	Aritmetický průměr	46
3.13.2	Směrodatná odchylka.....	46
3.13.3	T – test (též „studentův test“)	47
4.	Výsledky.....	48
4.1	Vliv ethephonu a ethephonu s AgNO ₃ na produkci izoflavonoidů v kalusové kultuře v různých koncentracích.....	49
4.2	Vylučování izoflavonoidů do média kalusové kultury po aplikaci ethephonu a ethephonu s AgNO ₃ v různých koncentracích	50
4.3	Vliv ethephonu a ethephonu s AgNO ₃ na produkci izoflavonoidů v suspenzní kultuře v různých koncentracích.....	51
4.4	Vylučování izoflavonoidů do média suspenzní kultury po aplikaci ethephonu a ethephonu s AgNO ₃ v různých koncentracích	52
5.	Diskuze.....	59
6.	Závěr	65
7.	Použitá literatura.....	67
8.	Seznam obrázků	72
9.	Seznam tabulek	73
10.	Seznam grafů.....	74

1. ABSTRAKT

Genista tinctoria L., kručinka barvířská z čeledi *Fabaceae*, je bohatým zdrojem izoflavonoidů (genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A) s potenciálně širokým terapeutickým účinkem. Obsahuje též chinolizidinové alkaloidy (cytisin, anagyrin, lupanin, spartein, atd.), které však pro jejich toxicitu nejsou žádoucí.

Proto se pro izolaci izoflavonoidů této rostliny využívají kultury *in vitro*, které jedovaté alkaloidy neprodukují a navíc dosahují vyšší produkce izoflavonoidů než mateřská rostlina. Pro zvýšení produkce izoflavonoidů se pak využívá metoda elicitace. Izoflavonoidy jsou studovány pro jejich fytoestrogenní účinky, které by mohly být využity v terapii menopauzálních symptomů či dokonce v terapii různých hormon-dependentních nádorů.

V této studii byl jako elicitor použit ethephon v koncentraci 7000 μM , 700 μM a 70 μM . Sledoval se také vliv inhibitoru ethephonu (AgNO_3) v koncentraci 120 μM . Vzorky byly odebírány po 24, 48, 72, 96 a 168 hodinách a analyzovány metodou HPLC. Vliv ethephonu a kombinace s jeho inhibitorem se sledovala u kalusových a suspenzních kultur. Zároveň se zjišťovalo uvolnění izoflavonoidů do živných médií obou kultur.

Nejvyšší produkce ze všech izoflavonoidů dosáhl daidzein v kalusové kultuře po ošetření ethephonem o koncentraci 700 μM po 96 hodinách (45,10 mg/g sušiny). Nejvíce statisticky významný inhibiční vliv na produkci izoflavonoidů byl zaznamenán u daidzeinu v kalusové kultuře po 72 hodinách od aplikace ethephonu o koncentraci 7000 μM . Inhibiční vliv AgNO_3 na účinky ethephonu se nejvíce projevil v obsahu daidzeinu v kalusové kultuře po ošetření ethephonem o koncentraci 700 μM . Bylo prokázáno vylučování izoflavonoidů do živných médií kalusových i suspenzních kultur.

ABSTRACT

Genista tinctoria, family *Fabaceae*, is a potent source of isoflavonoids (genistin, genistein, daidzein, formononetin, biochanin A) with a wide spectrum of potential medical impact. *Genista* also contains quinolizidin alkaloids (cytisin, anagyrin, lupanin, spartein, etc.), which are toxic.

The reason why *in vitro* cultures are used is an absence of toxic alkaloids production and higher yield of isoflavonoids in comparison with intact plant. For an increase of isoflavonoid production method of elicitation is being used. Isoflavonoids are studied for their phytoestrogenic effects, for which they could be used in treatment of postmenopausal symptoms and even in treatment of hormon-dependent tumours.

The elicitor ethephon in concentration of 7000 μM , 700 μM and 70 μM was used in this work. The effect of ethephon inhibitor (AgNO_3) in concentration of 120 μM was investigated too. Samples were examined after 24, 48, 72, 96 and 168 hours and then analysed by HPLC method. An effect of ethephon and its combination with AgNO_3 was observed in callus and suspension cultures. Release of isoflavonoides into culture media was studied too.

Daidzein production was the highest of all isoflavonoids in the callus culture after the treatment of ethephon in concentration of 700 μM after 96 hours (45,10 mg/g DW). The most significant inhibitory effect on isoflavonoids production was noticed daidzein production in the callus culture 72 hours after an application of ethephon in the concentration of 7000 μM . An inhibitory effect of AgNO_3 on the ethephon was the most expressed upon daidzein production in the callus culture after the treatment of ethephon in the concentration of 700 μM . The production of isoflavonoids in culture media of callus and suspension cultures was demonstrated.

ÚVOD

V dnešní době roste tendence k hledání léčivých přípravků v přírodě. Řada rostlin disponuje širokou paletou léčivých látek. Problémem však bývá efektivní získávání účinných látek z rostlin v takovém množství, aby jich bylo možné využít v průmyslovém měřítku. Možným řešením může být využití explantátových kultur jako atraktivního zdroje léčivých látek bez ohledu na podnebí či roční období. ¹ Metoda elicitace pak může přímo či nepřímo ovlivnit hromadění a metabolismus sekundárních metabolitů. ²

S rostoucím výskytem rakoviny prsu a endometria, se v současné době stále důležitějším stává hledání bezpečných chemoterapeutik. Předmětem mnohých výzkumů je též hledání léčiv využitelných ke zvládnutí symptomů vyvolaných klimakteriem.

Předpokládá se, že fytoestrogeny by mohly spadat do této skupiny léčivých látek a mohly by být použity také v prevenci těchto onemocnění. ^{1,2}

Fytoestrogenní účinky mají izoflavony, což jsou sekundární metabolity charakteristické pro čeleď *Fabaceae*. Rostliny rodu *Genista* produkují jedno z nejvyšších množství těchto potenciálně prospěšných látek. Pomocí biotechnologických metod se zkoumá možnost zvýšení produkce izoflavonů. Mnohé studie prokázaly, že zvýšené produkce se dá docílit využitím buněčných kultur, s využitím různých elicatorů, růstových regulátorů, či fyzikálních stresorů. ^{1,3}

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo se seznámit s technikou kultivace rostlinných kultur *in vitro*. Dále zjistit vliv abiotického elicitoru ethephonu na produkci izoflavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Genista tinctoria* a současně zjistit vliv AgNO_3 jako inhibitoru ethephonu. Na základě stanovení obsahu jednotlivých izoflavonoidů HPLC metodou zjistit, zda uvedený elicitor v různých koncentracích je schopen ovlivnit produkci těchto obsahových látek.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Genista tinctoria* – Kručinka barvířská

♀ ↓ K(5) C5 A (9)+1 n.10 G1 ⁴

Taxonomie ⁴

Říše	<i>Plantae</i>	rostliny
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>	krytosemenné rostliny
Třída	<i>Rosopsida</i>	vyšší dvouděložné rostliny
Řád	<i>Fabales</i>	bobotvaré
Čeleď	<i>Fabaceae</i>	bobovité
Rod	<i>Genista</i>	kručinka
Druh	<i>Genista tinctoria</i> L.	kručinka barvířská

3.1.1 Popis

Kručinka barvířská je více než půl metru vysoký, jedovatý polokeř se zelenými přímými, vystouplými, a beztrnnými větvemi, které jsou hranaté, lysé nebo nahoře přisedle ochlupené. Listy má jednoduché, přisedlé, eliptické až kopinaté, 9 - 50 x 2 - 15 mm, špičaté, na líci tmavozelené, lysé a na rubu světlejší a brvitě se silnými postranními žilkami.

Zlatožluté květy vyrůstají v mnohokvětých, vrcholových nebo latovitých hroznech a jsou motýlokvětého typu. Listence jsou velké zhruba 1 mm, květní stopky jsou 1 - 2 mm dlouhé a kalich je velký 3 - 7 mm, je nezřetelně dvoupyský. Plodem jsou úzce podlouhlé, čárkovité lusky se 6 - 10 semeny. Kručinka u nás roste v šesti poddruzích, které při sběru nerozlišujeme. Kvete od května do srpna. ^{4, 5, 6, 7}

Obrázek 1: Celá rostlina ⁵



Obrázek 2: Květenství⁸



3.1.2 Výskyt

Kručinka barvířská je poměrně hojná rostlina lesních křovin, suchých písčitých a hlinitých palouků nebo světlých listnatých lesů. Roste také podél cest, na rašelinných loukách, stráních a křovitých skalách. Jde o evrosibiřský a asijský druh. Na některých stanovištích je tak rozšířená, že ničí například travnatěpasekové plochy.

Ve Skandinávii se vyskytuje pouze synantropně, v Alpách chybí. U nás se vyskytuje na celém území roztroušeně až hojně od nížin po nižší polohy hor. Jde spíše o teplomilnou rostlinu, který dává přednost hlubokým, na dusík chudým, zásaditým půdám.^{4, 5, 6, 9, 10}

Sbírá se kvetoucí nať - *Herba Genistae tinctoriae*. Odřezává se asi v polovičce osy. Suší se ve stínu. Umělá teplota při sušení nesmí být vyšší než 35 °C. Droga je bez pachu a chutná nahořkle svíravě.^{5, 6}

3.1.3 Obsahové látky

Rod *Genista* je charakterizován přítomností flavonů, glykoflavonů a především vysokou koncentrací izoflavonů. ¹¹

Tyto rostlinné polyfenoly jsou studované pro potencionální ochranné účinky na lidské zdraví. Z polyfenolů jsou důležité flavonoidy, což jsou deriváty fenylochromanu. Dělí se na flavany, izoflavany a neoflavany (viz obrázek 5). Deriváty flavanu se rozlišují podle stupně oxidace pyranového kruhu na další skupiny, například flaveny, flavanony, flavanoly a další. ^{12, 13}

Od 3-fenylochromanu jsou pak odvozeny izoflavonoidy, kterých obsahuje *Genista* asi 0,5 - 3 %. Rozdělují se dle stupně oxidace a přítomnosti dalších heterocyklů na základním skeletu. Zahrnují izoflavany, izoflavanony a izoflavony, které jsou nejrozšířenější. Izoflavony jsou nejlépe prostudované fytoestrogeny. Mezi nejdůležitější izoflavonoidy patří genistein, daidzein, genistin, formononetin a biochanin A. Přednostně se vážou na β -estrogenní receptory, které se nachází v CNS, urogenitálním traktu, kostech, či ve stěnách cév. Genistein má téměř ekvivalentní afinitu k β -estrogenním receptorům jako 17- β -estradiol. ^{13, 14, 15}

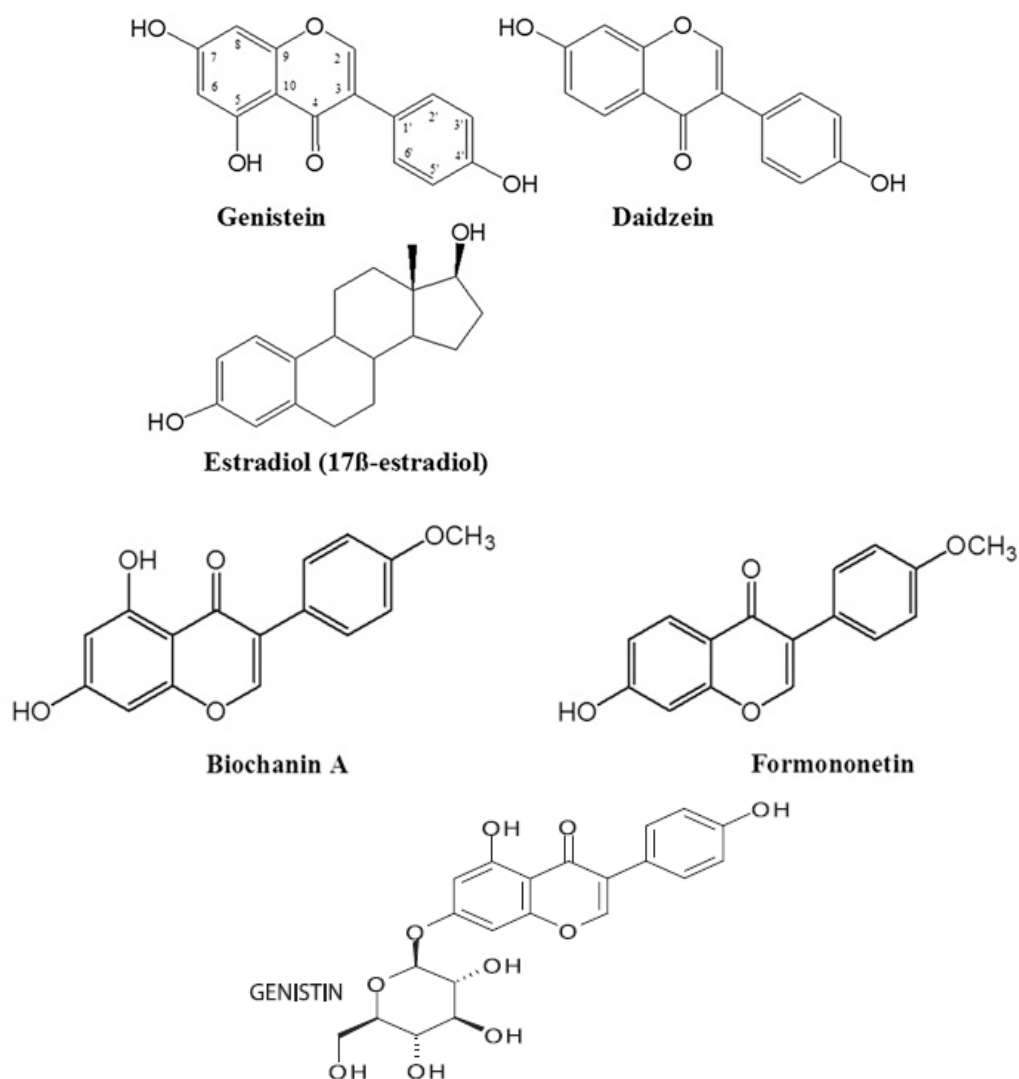
Izoflavonoidy plní funkce v obranném systému rostliny jako přirozená ochrana proti infekci při klíčení semen, napadení hmyzem a poškození škůdci. Pro získávání izoflavonoidů je dnes nejvíce využívána čeleď *Fabaceae*, ale byly prokázány i v čeledích *Iridaceae* a *Euphorbiaceae*, také u rodu *Podocarpus* sp., či *Juniperus* sp. ¹³

Při metabolizaci v gastrointestinálním traktu savců dochází k přeměně biochaninu A a formononetinu na genistein, resp. daidzein. Daidzein může být dále přeměněn na dihydrodaidzein a poté na O-desmethylangolensin a equol (účinný metabolit daidzeinu vznikající činností střevní mikroflóry). Equol je metabolizován jednotlivými organismy velmi individuálně, což může být důvodem jistých rozdílů ve výsledcích studií estrogenních účinků izoflavonoidů. Genistein je lidským organismem metabolizován na dihydrogenistein a dále na 6'-hydroxy-O-desmethylangolensin a hormonálně inertní p-ethylfenol. ^{13, 16}

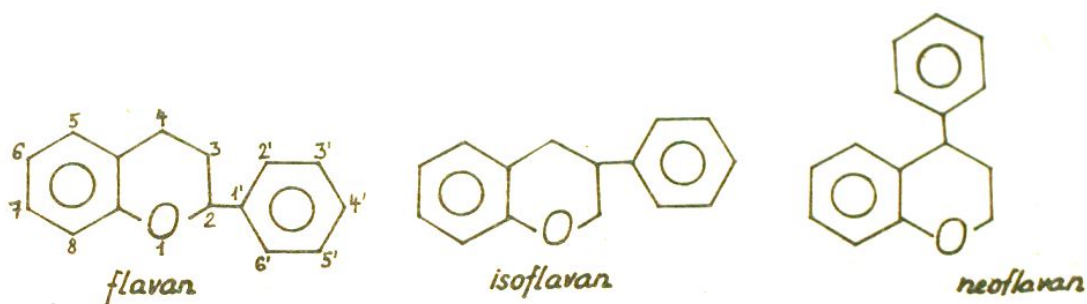
Celá rostlina obsahuje chinolizidinové alkaloidy, které jsou pro čeleď *Fabaceae* charakteristické, a to zhruba 0,3 - 0,8 %. Jde například o cytisin, N-methylcytisin, anagyrin, lupanin, tinktorin a spartein. Směrem ke konci vegetace se obsah alkaloidů zpravidla mírně zvyšuje.¹⁰

Květy jsou bohaté na flavonové glykosidy jako agenin, luteolin a apigenin. Vedle toho rostlina obsahuje také silice, hořčiny, třísloviny, terpenoidy (menthol, bornylacetát, anethol), fytoosteroly (stigmasterol, γ -sitosterol atd.), olefiny a další látky.^{4, 5, 6, 7, 17}

Obrázek 3: Chemické struktury estradiolu, genisteinu, daidzeinu, genistinu, formononetinu a biochaninu A^{14, 16}



Obrázek 4: Strukturní vzorce flavanu, izoflavanu a neoflavanu ¹²



3.1.4 Účinky rostliny a její terapeutické využití

Mnoho druhů rodu *Genista* vykazuje zajímavé biologické účinky, jako je například účinek estrogenní, hypoglykemický, protizánětlivý, antiulcerózní, spasmolytický, antioxidační, antivirotický, antimykotický a analgetický. Dalším zajímavým účinkem, který se zkoumá, je pak cytotoxicita vůči různým nádorovým buňkám. Biologické účinky izoflavonoidů jsou podmíněny vazbou fenylu na třetí uhlík. ^{11, 16}

Izoflavony ovlivňují metabolismus pohlavních hormonů. Vysoké dávky izoflavonu již po krátké době mohou u mužů vyvolat nárůst hladiny tyrotropinu, přičemž hladiny trijódtyroninu a tyroxinu se nemění. Nárůst hustoty kostí u žen po menopauze po užívání izoflavonů se vysvětluje zvýšením apoptózy osteoklastů. Pozitivní alosterická modulace GABA-A receptorů, jakožto možná příčina sedativního účinku izoflavonoidů, byla potvrzena pro genistein i metabolit daidzeinu. ¹⁵

Genistein působí proti různým typům rakoviny tím, že ovlivňuje apoptózu, buněčný cyklus, angiogenezi a inhibuje růst metastáz. Vykazuje též synergické účinky se známými protinádorovými léky, jako je například docetaxel a tamoxifen. Poprvé byl izolován z rostliny *Genista tinctoria* v roce 1899 a dal tak jméno tomuto rodu. ¹⁴

Usušená kvetoucí nať se používá hlavně v lidovém léčitelství jako diuretikum, při léčbě dny a revmatismu. Kručinka působí diuretický hlavně pro obsah flavonů a silice. Močopudný účinek, lze využít i při oběhové nedostatečnosti. Účinnost je zřejmá hlavně u lidí s nízkým krevním tlakem. Droga také zrychluje střevní peristaltiku. Vypocením též pomáhá tělu vyloučit různé škodlivé látky a přebytečné soli. Ovlivňuje cévní soustavu a látkovou výměnu. Vnitřně se používá ve formě nálevů pro zvýšení

průtoku krve ledvinami při chorobách dolních cest močových a nemocech ledvin. Doporučuje se též při otocích. Při vyšším dávkování může droga vyvolat nauzeu. Jako fytofarmakum se extrakt z čerstvých nadzemních částí rostlin používá v homeopatii. Přípravky z extraktů rostliny *Genista tinctoria* jsou používány také při onemocnění štítné žlázy. Dříve se používala jako barvířská rostlina. ^{5, 6, 16, 17, 18}

Jak již bylo zmíněno, kručinka je jedovatá rostlina. Nositelem toxického účinku jsou alkaloidy, které obsahuje. Nebezpečí hrozí hlavně pasoucím se zvířatům. Zvláště citlivé na anagyrin jsou ovce a krávy, které se mohou otrávit například kručinkou obsaženou v seně, sklizeném ze suchých podhorských luk. Příznaky akutní otravy jsou podobné jako u otravy nikotinem. ¹⁰

Dlouhodobá expozice estrogenům při hormonální substituční terapii souvisí s vysokým rizikem rakoviny prsu a endometria, což vybízí k hledání bezpečnějších alternativ. Skupina látek s potenciálním prospěchem jsou právě izoflavony s fytoestrogenní aktivitou. ³

Působí jako selektivní modulátory β -estrogenních receptorů. Vykazují agonistickou nebo antagonistickou aktivitu v závislosti na lokální koncentraci estrogeneru. Chrání též buňky před oxidativním poškozením a inhibují angiogenezi. Mají také budoucnost v léčbě potíží souvisejících s klimakteriem (návaly horka, osteoporóza, vulvovaginální potíže, kardiovaskulární onemocnění). ^{3, 19}

Četné studie dokazují, že pravidelná konzumace potravin bohatých na izoflavony, může snížit riziko vzniku rakoviny prsu a prostaty. Genistein a daidzein mají též slibné účinky pro léčbu diabetu, obezity a neurodegenerativních onemocnění. ¹⁹

Kalusové kultury různých druhů rodu *Genista* jsou využívány ve výzkumu s cílem produkovat izoflavony. Jsou optimalizovány pro jejich růst a produkci a to obměnou různých složení médií a různou mírou expozice světla. Dále také použitím různých elicitorů (například methyl jasmonát, chitosan), růstových regulátorů (například kyselina abscisová), či fyzikálních stresorů (například UV záření). ^{1, 3, 11}

Bylo prokázáno, že kalusové kultury všech druhů kručinky produkovaly více izoflavonů, než mateřská rostlina a právě druh *Genista tinctoria* je schopen produkovat jedno z největších množství izoflavonoidů. Tyto látky produkují mimo kručinku také červený jetel (*Trifolium pratense*) či sója (*Glycine max*).^{1,2}

Dalším pozitivem kalusových, ale i suspenzních kultur je to, že produkují jen omezené množství jedovatých alkaloidů. Toto množství je v 2-3 násobně nižší koncentraci, nežli produkuje mateřská rostlina. Vysvětlením nižšího obsahu alkaloidů může být jejich rychlá degradace endo- a exoenzymy.²⁰

3.2 Explantátové kultury rostlin

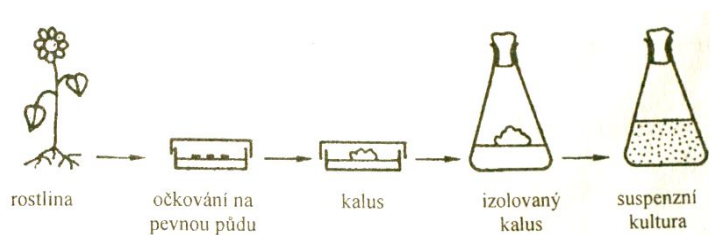
Rostliny dokáží diferencované buňky a pletiva převést do meristemického stavu, kdy dochází k intenzivnímu buněčnému dělení, s následnou cytodiferenciací a regenerací orgánů, resp. celých rostlin. Rostlinná somatická buňka je totipotentní, což znamená, že obsahuje veškerý genetický materiál potřebný pro regeneraci celé rostliny. Díky totipotenci je možné v explantátových kulturách vegetativní množení rostlin, které probíhá za definovaných *in vitro* podmínek. Teoreticky je jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem vhodné pro odvození explantátové kultury.^{21, 22, 23}

Kultury rostlinných explantátů znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin, orgánů, pletiv, buněk či protoplastů za umělých podmínek. To znamená, že se ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny oddělí určitá část, umístí se do sterilního prostředí a nechá se kultivovat za definovaných podmínek. Počátky této problematiky sahají až do roku 1756, kdy Duhamel de Monceau popsal tvorbu kalusu a pupenů na uměle poraněném kmeni jilmu. Od té doby se o toto téma zajímalo stále více vědců, ze kterých lze jmenovat například Vöchtiga, Sachse, Rechingera, Haberlandta, Whitea, Skooga, Millera a mnoho dalších. Svými postřehy a objevy umožnili výzkum rostlin *in vitro* a jeho využití v biochemických, fyziologických, morfologických nebo genetických studiích.^{21, 24}

Organogeneze probíhá tak, že buňky trvalých pletiv explantátů přenesené do kultivačního média se po určité době začínají dělit. Vytvoří se tak kalusové pletivo. Tento vývoj má tři fáze a to indukci růstu, začátek buněčného dělení a cytodiferenciaci. Mnohobuněčný explantát je většinou tvořen buňkami i pletivy různého typu, které reagují na nové prostředí kultury *in vitro* různě. Mitotické dělení probíhá převážně v povrchových buněčných vrstvách. Centrální zóny se nedělí. Mitotickou aktivitu může ovlivnit anaerobní prostředí, reakce na poranění, zvýšená dostupnost živin, rychlejší uvolňování inhibitorů a také vliv světla na povrchové vrstvy explantátu. ²²

Po nárůstu dostatečného množství buněk ve formě kalusu je možné je opakovaně přenášet na čerstvé živné půdy a udržovat tak získanou kulturu v aktivním stavu. Tento proces se nazývá pasážování a pletivo takto získává v podstatě neomezenou životnost. Z kalusové kultury je možné získat kulturu suspenzní. ^{23, 25}

Obrázek 5: Odvození Explantátové kultury z rostliny ²³



Pro kultivaci suspenzních kultur je důležité promíchávání kvůli provzdušnění, čímž se podpoří metabolické procesy. Promíchávání probíhá na pomaloběžném třepacím stroji. ²³

Růst kultury závisí na obsahu růstových látek, vitaminů a ostatních živin, kterými se liší různé druhy médií. ²⁵

Na růst a vývoj mohou mít vliv i faktory prostředí, jako teplota, světlo, či obsah vody. Při vysokých teplotách (nad 40°C) v závislosti na době působení, dochází ke vzniku toxických látek, nebo také ke koagulaci bílkovin základní cytoplasmy. Při nízkých teplotách zase mohou vznikat krystaly ledu v mezibuněčných prostorech, což může vést k dehydrataci buňky, kvůli odebrání vody cytoplasmě. Vhodná teplota pro růst kalusu je obvykle 25 ± 2 °C.

Vliv světla na růst rostlin je vztahován jen na nadzemní orgány autotrofních vyšších rostlin. Rostliny jsou přizpůsobeny střídání délky dne a noci neboli fotoperiodě. Světelná perioda vhodná pro růstu kultury je obvykle 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Světlo může způsobovat degradaci rostlinných hormonů v kultivačním médiu. Bylo také zjištěno, že pletiva rostoucí ve tmě produkují více ethylenu než pletiva kultivovaná na světle. Voda ovlivňuje embryonální růst a hlavně růst prodlužovací. Záleží však na druhu rostliny i na typu orgánu. ^{24, 25, 26}

Kalusy se proto pěstují ve speciálních kultivačních místnostech s definovanými kultivačními podmínkami pro světlo (dostatečná intenzita, vhodné spektrální složení), teplotu (nutnost řízené klimatizace), vlhkost vzduchu a koncentraci plynů (správná ventilace kultivačních nádob). ^{25, 27}

Mezi základní podmínky úspěšné kultivace explantátových kultur je zajištění sterility (sterilita rostlinného materiálu používaného jako explantát, sterilitou kultivačních médií a sterilitou prostředí, ve kterém jsou tkáňové kultury realizovány). Bez tohoto kroku existuje vysoké riziko kontaminaci kultur plísněmi či bakteriemi, jelikož živná média používaná pro tkáňové kultury rostlin mají pro růst organismů ideální podmínky. ²¹

- Druhy sterilizace** ²¹ :
- ultrafialové záření (nepoužitelné pro kultury) pomocí germicidní zářivky nebo „horského slunce“
 - dezinfekční roztoky (např. chlornan vápenatý, chlornan sodný, peroxid vodíku, ethanol, dusičnan stříbrný, atd.)
 - horkovzdušný sterilizátor (při 140°C 90 min., při 120°C 120 min.)
 - autoklávování, neboli sterilizace horkou parou za zvýšeného tlaku (při 121°C a přetlaku 100 kPa)
 - filtrace se speciálními membránovými filtry s velikostí pórů menší než 0,2 μm

3.2.1 Využití explantátových kultur

- množení rostlin (mikropropagací či klonováním)
- alternativní příprava produktů získávaných dosud z rostlin v polní kultuře
- získávání produktů obsažených v nesnadno pěstovaných rostlinách
- získávání nových látek, pomocí změny metabolismu explantátových rostlinných buněk, které mateřská rostlina, ze které byla kultura odvozena, neobsahuje
- produkty biotransformací
- kultivace izolovaných meristémů jako metoda ozdravování rostlin od virových infekcí
- regulace procesu oplození a jeho ovlivnění v podmínkách *in vitro*
- inkorporace cizího genetického materiálu do buněk s cílem modifikace rostlinného genomu^{21, 23}

Explantátové kultury mohou obsahovat vyšší obsah některých sekundárních metabolitů, než samotná matečná rostlina. Tohoto hromadění sekundárních metabolitů se využívá například u rostliny *Papaver somniferum*, ze které se získává kodein a morfin nebo u *Catharanthus roseus*, ze kterého se získává vinkristin a ajmalicin.²³

Biotransformace neboli schopnost explantátové kultury rostlinných buněk transformovat exogenně dodané látky (oxidací, redukcí, hydroxylací, metylací či demethylací), se prakticky využívá například při izolaci (hydroxylací) digoxinu, který obsahuje *Digitalis lanata*. Některé reakce, jako například hydroxylace a glykosylace, totiž nelze provést chemicky ani mikrobiologicky.²³

3.2.1.1 Výhody mikropropagace^{23, 26}

- k odvození kultury postačuje velmi malá část rostliny a nevyžaduje se velký prostor
- sterilní podmínky této metody zabraňují virovým a mikrobiálním nákazám
- možnost produkce druhů rostlin (nebo klonů rostlin), které se pomocí tradičních metod vegetativního množení nemnoží vůbec nebo jen pomalu
- nezávislost na ročním období, klimatických podmínkách a půdních poměrech
- pro získávání sekundárních metabolitů z léčivých rostlin není potřeba díky množení *in vitro* celých rostlin a tak se šetří jejich výskyt v přírodě

3.2.1.2 Nevýhody mikropropagace²³

- relativně drahé laboratorní vybavení
- poměrně vysoká pracnost metody bez možnosti mechanizace

3.2.2 Rozdělení explantátových kultur dle kultivovaného explantátu:²⁴

- kultury izolovaných semen (v různém stádiu vývoje či zralosti)
- kultury izolovaných embryí (v různém stádiu vývoje či zralosti)
- kultury vegetativních orgánů či jejich částí (kořeny, stonky, listy, meristémy, pupeny)
- kultury generativních orgánů (květní pupeny, poupata, květy, pestíky, tyčinky, prašníky, pylová zrna, spory, gametofyty)

- kalusové kultury
 - buněčné kultury
 - protoplastové kultury
- } odvozeny od prvních tří typů kultur, případně jedna od druhé

3.2.3 Složení kultivačního média ²¹

Složení kultivačního média je jeden z nejdůležitějších faktorů, který ovlivňuje růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin. Většinou obsahuje makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo další zdroj organického dusíku, sacharidy, další nedefinované organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory.

Existují různé druhy médií, mezi nejčastěji používané média patří média, která popsali White (1963), Murashige a Skoog (MS, 1962), Gamborg a kol. (B5, 1968), Gautheret (1942), Shenk a Hildebrandt (SH, 1968), Nitsch a Nitsch (1969) a Lloyd a McCown (1981). Media MS, SH a B5 mají oproti ostatním druhům vysoký obsah makroelementů. Složení média se odvíjí mimo jiné též od fáze rozmnožovacího cyklu rostliny. Pomocí kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu draselného se vždy upraví pH média zhruba na hodnotu 5,5 – 6,0 nebo v některých případech na 6,0 – 7,0.

3.2.3.1 Makroelementy:

Zahrnují nejdůležitější prvky, jako jsou dusík, fosfor, draslík, hořčík a síra. Jejich optimální koncentrace pro dosažení maximální růstové rychlosti závisí na konkrétním rostlinném druhu. Anorganický dusík by měl být alespoň v koncentraci 25 – 60 mM. Dodává se v nitrátové formě (dusičnan draselný) v koncentraci 25 – 40 mM a ve formě amonických solí (dusičnan amonický) v koncentraci 2 – 20 mM. Pro některé druhy je potřebný i redukovaný dusík, který je dodáván ve formě organických sloučenin (např. aminokyseliny). Koncentrace draslíku (ve formě dusičnanu či chloridu) v médiu bývá 20 - 30 mM a koncentrace fosforu, hořčíku, síry a vápníku bývá v rozmezí 1 - 3 mM. ^{21, 27}

Dusík je potřebný pro tvorbu jednoduchých aminokyselin a amidů. Druhotné přeměny vedou ke tvorbě všech aminokyselin, nukleových bazí, alkaloidů, atd. Jeho nadbytek prodlužuje vegetační dobu. Síra je důležitá pro syntézu proteinů. Při jejím nedostatku dochází k hromadění nerozpustných dusíkatých látek a sacharidů v rostlině. Díky fosforu dochází k tvorbě fosfátové esterové vazby, která má vysokou energii. Je také stavební jednotkou cytoplazmy, proteinů a lipidů. Draslík ovlivňuje syntézu bílkovin, polymeraci sacharidů, aktivuje transport asimilátů z listů k reprodukčním orgánům a zvyšuje hydrataci protoplazmy. Hořčík je důležitým prvkem pro energetické přeměny v buňce a je složkou chlorofylu. ²⁵

3.2.3.2 Mikroelementy

Zahrnují železo, mangan, zinek, bor, měď, a molybden. Někdy také kobalt, jód, sodík a chlór, které ale nejsou pro růst kultury nezbytné. Železo a zinkem bývají ve formách chelátů a to v koncentracích 100 μM (Fe) a 5 - 30 μM (Zn). Koncentrace mědi a kobaltu bývá 0,1 μM , molybdenu 1 μM , jódu 5 μM , manganu 20 – 90 μM a boru 25 – 100 μM . ^{21, 27}

Železo slouží jako katalyzátor tvorby chlorofylu, mangan navíc ještě metabolismus IAA. Měď chlorofyl stabilizuje a zintenzivňuje oxidační pochody, ale vyšší koncentrace jsou pro rostlinu toxické. Zinek ovlivňuje koncentraci sacharidů a jejich transport a ovlivňuje také biosyntézu IAA. Bor je nezbytný pro asimilaci dusíku nitrogenními bakteriemi, pro redukci dusičnanového aniontu. Kobalt napomáhá biosyntéze chlorofylu. ²⁵

3.2.3.3 Zdroj uhlíku a energie ²¹

Nejčastěji se používá sacharóza v koncentraci 2 - 3 %, kvůli převážně heterotrofní výživě explantátů (autotrofně se vyživují pouze omezeně). V médiu se může sacharóza rozštěpit na glukózu a fruktózu a k její částečné hydrolyze může dojít též při autoklávování média.

3.2.3.4 Vitamíny^{21, 27}

Tyto pro rostlinu nezbytné katalyzátory řady metabolických procesů mohou být pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* limitujícím faktorem pro jejich růst. Nepostradatelným vitamínem je thiamin, který se používá v koncentraci 0,1 - 10 mg/l. Dále se používají například i tyto vitaminy v uvedených koncentracích: kyselina nikotinová (0,1 - 5 mg/l), pyridoxin (0,1 - 10 mg/l) a myo-inositol (50 - 5000 mg/l), biotin. Myo-inositol se nejspíš také účastní při tvorbě fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, které hrají roli v buněčném dělení. Někdy se do kultivačních médií přidávají také biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantothenová a riboflavin.

3.2.3.5 Aminokyseliny²¹

Přidávají se do živných médií přesto, že je kultivované rostlinné buňky dokáží syntetizovat samy a to hlavně v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Slouží buňkám jako zdroj dusíku nebo bývají využívány přímo k syntéze proteinů. Samotné aminokyseliny však mohou ve vyšších koncentracích růst inhibovat. Koncentrace aminokyselin, která růst stimuluje, se nejčastěji používá 1 - 100 mg/l a závisí na druhu těchto aminokyselin. Jako zdroj dusíku se podává směs aminokyselin, například kasein hydrolyzát v koncentraci 0,05 - 0,1 %, dále L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin.

3.2.3.6 Nedefinované organické složky médií²¹

Do živných médií explantátových kultur se mohou přidat i další látky stimulující růst. Jejich použití je však omezené právě pro jejich nedefinované složení. Příkladem může být protein hydrolyzát v koncentraci 0,05 - 0,1 % a kokosové mléko v koncentraci 5 - 20 %, které se používají nejčastěji, dále kvasničný extrakt, sladový extrakt, extrakt z banánů a pomerančové či rajčatové šťávy.

Dalším příkladem může být aktivní uhlí v koncentraci 0,5 - 1 %, které může stimulovat růst explantátů absorpcí toxických fenolických sloučenin produkovaných rostoucím explantátem. V živném médiu absorbuje látky inhibující růst, dále absorbuje růstové regulátory (jeho inhibiční efekt) a způsobuje ztmavnutí média.

3.2.3.7 Látky používané pro zpevnění média²¹

Nejčastěji používanou látkou pro přípravu tuhých médií je agar. Výhodou je jeho stabilita při teplotě používané ke kultivaci. S vodou tvoří gel při teplotě 60 - 100°C, který při 45°C tuhne. Tuhost lze ovlivnit použitou koncentrací agaru (obvykle 0,8 – 1 %), druhem agaru a pH média. Agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy, což je jeho dalším benefitem. Důležitá je jeho čistota, obsahuje vápník, hořčík, draslík, a sodík. Je možné, že obsahuje též sacharidy a stopy aminokyselin a vitaminů. Změny koncentrace agaru v médiu mohou tedy ovlivnit i koncentraci některých prvků v živném médiu. Další možné látky ke zpevnění média jsou agaróza, Phytigel a Gerlite. Jde o látky syntetické. Bez použití těchto zpevňujících látek, lze explantáty upevnit také na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě či perforovaném celofánu.

3.2.3.8 Růstové regulátory

Jde o rostlinné hormony (fytohormony) a syntetické látky, které mají kromě vztahu k růstu, také vztah k vývoji rostlin. Mohou mít stimulační nebo inhibiční účinek.²⁶ Mezi růstové regulátory řadíme auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou, ethylen a další. Růst explantátových kultur se neodvíjí pouze na základě jejich koncentrace, ale také dle jejich vzájemných poměrů. Takový poměr například u auxinu a cytokininu, který by vedl k morfogenezi, je závislý na druhu rostliny, kultivaru a explantátu. Když je poměr auxinu a cytokininu vysoký, stimuluje se iniciace tvorby kořenů, kalusu a embryogeneze. V případě jejich nízkého poměru je stimulována tvorba adventivních nebo axilárních prýtů.^{21, 22, 24}

AUXINY pro tkáňové kultury rostlin mají různou fyziologickou aktivitu, pohybují se různou rychlostí pletivy, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jsou jinak metabolizovány. Patří k nejdéle známým rostlinným hormonům. V kultivačním médiu stimulují růst kalusu a buněk, někdy indukují tvorbu prýtlů a kořenů, nebo také somatickou embryogenezi a stimulují růst prýtlů. ^{21, 24}

- kyselina indolyloctová (IAA) – N (nativní)
- kyselina indolylmásečná (IBA) – S (syntetická)
- kyselina naftyloctová (NAA) – S
- kyselina chlorfenoxyoctová (4-CPA) – S
- kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T) – S
- kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) – S
- kyselina 3,6-dichlor-2-metoxybenzoová (dicamba) –S
- kyselina 4-amino-3,5,6-trichlorpikolinová (picrolam) – S

Prekurzorem IAA je tryptofan. Její účinek je závislý na koncentraci. Podporuje hlavně prodlužovací růst, dále vyvolává či zesiluje mitotickou aktivitu pletiva, ovlivňuje viskozitu protoplazmy a stupňuje příjem vody. Syntetické látky se s oblibou používají proto, že nejsou enzymově rozkládány. ²⁵

CYTOKININY pro kultivační média stimulují buněčné dělení a stimulují tvorbu axilárních prýtlů. Mohutné buněčné dělení spojené se zrychlenou syntézou DNA vyvolávají již při velmi nízkých koncentracích, za přítomnosti IAA. Stimulují diferenciaci chloroplastů a syntézu chlorofylu. Stimulují také klíčení semen.

- benzylaminopurin (BAP) – S
- 6-dimethylaminopurin (2iP = IPA) – N
- furfurylaminopurin (kinetin) – S
- zeatin – N

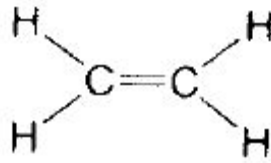
Nativně se vyskytující adenin má někdy také cytokininovou aktivitu. ^{21, 25}

GIBERELINY (GA₃ a GA₇) jsou diterpenické kyseliny. Spolu s ABA nejsou v kulti-vačním médiu nezbytné, ale mohou stimulovat růst některých druhů explantátů. Je známo zhruba 70 typů. Kyselina giberelová (GA₃) stimuluje růst buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, dále stimuluje růst kalusu a růst zakrslých rostlin. Podporují syntézu IAA. ^{21, 25}

Kyselina **ABSCISOVÁ** (ABA), po chemické stránce seskviterpenická kyselina, v závislosti na rostlinném druhu stimuluje či inhibuje růst kalusu, dále stimuluje proliferaci prýtlů a inhibuje pozdější fázi embryogeneze. Mimo jiné urychluje buněčné stárnutí a inhibuje klíčení. ^{21, 25}

ETHYLEN je stálý bezbarvý plyn, jehož účinky byly objeveny v rámci studování vlivu svítivplynu na růst klíčnicích rostlin, ruským fyziologem D. N. Neljubovem v roce 1901. Jde o zatím jediný známý plynný hormon. Rostliny jej produkují ve zvýšené míře například ve stresových podmínkách. Výrazný nárůst produkce ethylenu nastává během zrání plodů, stárnutí a opadu plodů a květů. Při stresu nebo poranění dochází v průběhu půl hodiny až k několikanásobnému nárůstu jeho produkce. Tento plynný uhlovodík je produkován téměř všemi částmi rostlin, ale nejvíce ho produkují rostoucí části rostlin. V malém množství se běžně vyskytuje v plodech. Biologicky aktivní je i v malých koncentracích. Mezi jeho účinky patří inhibice dlouhivého růstu a stimulace růstu radiálního (při jeho velmi nízkých koncentracích), inhibice růstu stonků a kořenů, u vodních rostlin naopak dlouhivý růst stimuluje, má velký vliv na dozrávání některých plodů a lze jím také vyvolat klíčení ve tmě. Biosyntéza vychází z methioninu. V rostlinách působí tak, že se váže na určité bílkoviny. Tuto vazbu dokáží inhibovat například stříbrné ionty. Dusičnan či thiosíran stříbrný se tedy používají jako látky zne-možňující účinky ethylenu. IAA jeho tvorbu stimuluje a naopak ethylen brzdí syntézu IAA. Prakticky se využívá, jak již bylo zmíněno při dozrávání ovoce v kontrolované atmosféře. Jeho antagonisté (například ionty stříbra) se využívají při skladování řezaných květů a v mnoha *in vitro* regeneračních systémech ke zvýšení regenerace. V obilnářství se jako retardant využívá regulátor Ethrel (viz kapitola Ethepon), z něž je ethylen uvolňován v rostlinných pletivech. ^{24, 25, 28}

Obrázek 6: Chemický vzorec ethylenu ²⁸



3.3 Metoda elicitace ²⁹

Rostliny a *in vitro* pěstované buňky vykazují morfologické a fyziologické změny jako odpověď na různé mikrobiální, fyzikální a chemické faktory, známé jako elicitory. Elicitory jsou stresory spouštějící obranné mechanismy rostlin. Elicitace je tedy proces indukce nebo urychlení syntézy sekundárních metabolitů u rostlin. Jedná se tedy o průmyslové využití mechanismu, jež má přirozený význam ve strategii přežití rostliny. Aplikace elicitoru, jež je v současné době předmětem rozsáhlých výzkumů, se považuje za jednu z nejefektivnějších metod použitelných ke zvýšení syntézy sekundárních metabolitů u rostlin pro terapeutické účely.

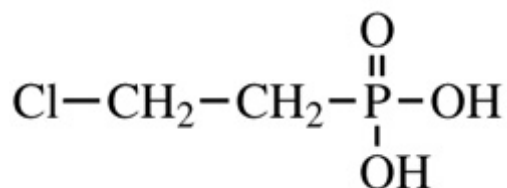
Sekundární metabolity rostlin jsou unikátním zdrojem farmak, potravinových aditiv a dalších materiálů používaných v průmyslu. Akumulace těchto metabolitů se často objevuje u rostlin vystavených stresu, nebo také právě různým elicatorům. Elicitory dělíme do dvou skupin na biotické a abiotické. Biotické elicitory mají biologický původ odvozený od různých patogenů (mykotické, virové, bakteriální) nebo z rostliny samotné. Zatímco abiotické elicitory jsou faktory fyzikální (teplota, pH, UV záření, mechanické vlivy atd.) a chemické (vápník, stříbro, mannan, pektin, alginát, celulóza atd.). Dle interakce elicitoru s rostlinou je můžeme dělit i na elicitory rodově specifické a nespecifické. Optimální účinnost elicatorů závisí na mnoha faktorech jako je specifická a koncentrace použitého elicitoru, trvání a průběh expozice rostliny elicatoru, růstové stádium kultury, regulátory růstu a zastoupení jednotlivých živin v médiu.

3.3.1 Ethephon

Ethephon je 2-chlorethylfosfonová kyselina. Známý je též pod názvem etherel, camposan nebo β -chlorethylfosfonová kyselina.

Molekulární vzorec látky je $C_2H_6ClO_3P$. Je to bílý krystalický prášek o molekulové hmotnosti 144,5 g/mol.³⁰

Obrázek 7: Chemická struktura ethephonu³¹



Ethephon je snadno rozpustný ve vodě, methanolu, ethanolu, isopropanolu, acetonu, diethyletheru a dalších polárních organických rozpouštědlech. Je mírně rozpustný v nepolárních organických rozpouštědlech, jako je benzen a toluen. Prakticky nerozpustný je v petroletheru a naftě.³⁰

Ethephon je všeobecně rozšířený pesticid (GUP – generally used pesticide), jež je zároveň regulátorem růstu rostlin. Po kontaktu s rostlinou rychle prostupuje tkáněmi a je rozkládán na fosfát, ethylen a chlorid. Vlastní účinek ethephonu je zprostředkován uvolněným ethylenem, který samotný interferuje s růstovými procesy (viz kapitola 3.2.3.8).³²

Praktické využití ethephonu jako růstového regulátoru je při předsklizňovém dozrávání ovoce, rajčat, řepy, kávy a dalších plodů. Je také používán k usnadnění sklizně ovoce a bobulovin (akcelerace uvolnění plodů od mateřské rostliny) a urychluje posklizňové dozrávání (například u banánů). Dále například stimuluje proudění latexu ve stromech kaučukovníku a urychluje zrání tabáku.³¹

Bylo ale zjištěno, že vysoké koncentrace ethyleny v rostlinné kultuře mají za výsledek nižší výnosy sekundárních metabolitů a zpomalení růstu biomasy. Toto naznačuje, že ethylen má příznivý účinek na biosyntézu sekundárních metabolitů v buňkách a tkáních kultivovaných rostlin pouze v nižších koncentracích.^{29, 33, 34, 35}

Sung a Huang v roce 2000 přinesly zprávu o tom, že aplikace ethephonu snížila obsah sušiny a také akumulaci L – DOPY (L-dihydroxyphenylalanin) v kultuře *Stizolobium hassjoo*. Inhibice způsobená ethylenem, v důsledku působení ethephonu, byla zmírněna aplikací CoCl_2 a AgNO_3 . Aplikace těchto dvou inhibitorů ethephonu měla za následek sníženou tvorbu ethylenu, což vedlo k významně vyšší hmotnosti sušiny a produkci sekundárního metabolitu L-DOPA. ³⁶

3.3.2 Ethephon a výzkum

Ve studii z roku 2013 bylo zjištěno, že rostliny kayenského pepře po ošetření ethephonem vykazovaly významně vyšší relativní podíl v zastoupení žádoucích červených lusků oproti pro sklizeň nevhodným luskům zeleným. Výsledky poukázaly na to, že ethephon podporuje vyzrávání červených lusků kayenského pepře, které je nutné k dosažení stadia, kdy je úroda vhodná pro mechanickou sklizeň. Aplikace ethephonu takto snížila množství lidské práce, která by jinak musela být vynaložena k odstranění zelených lusků před samotným zpracováním úrody. Toto ilustruje schopnost ethephonu, jako regulátoru růstu, uspořádat dozrávání plodů rostlin. ³⁷

Vliv ethephonu jako elicitoru na maturaci rostlin ilustrují i dvě studie provedené na rajčatech (*Lycopersicon lycopersicum*). Obě studie shledaly ethephon jako účinný prostředek k podpoře vyzrávání rostlin. Studie Wanga z roku 2011 dokonce prokázala i vyšší obsah červeného barviva lycopenu v plodech rostlin ošetřených ethephonem. ^{38, 39}

Ve studii z roku 2008 Goyal a Ramawat využili buněčnou kulturu bobovité liány, *Pueraria tuberosa*, k získání izoflavonoidů (puerarin, genistin, daidzein, genistein). Přidání 100 μM ethephonu do této kultury mělo za následek čtrnáctinásobné zvýšení obsahu těchto izoflavonoidů po 48 hodinách. Přidání inhibitorů ethephonu (dusičnan stříbrný a thiosíran stříbrný) vedlo k naprostému vyrušení efektu ethephonu a izoflavonoidy nebyly detekovány vůbec. Tato studie dokazuje stimulační vliv ethephonu na produkci sekundárních metabolitů rostlin a inhibiční vliv stříbrných iontů na jeho účinek. ⁴⁰

Stejně tak studie z roku 2009, ve které byly různé elicitory aplikovány na *Catharanthus roseus* (barvínek růžový) s cílem zjistit jejich efekt na biosyntézu vinblastinu, vindolinu a kataranthinu, jež jsou cennými složkami protinádorových farmak. Bylo zjištěno, že ošetření salicylovou kyselinou a ethephonem vedlo k signifikantnímu zvýšení obsahu všech těchto sekundárních metabolitů.³⁴

Studie z roku 2016 se zabývala účinkem ethephonu a světla a jejich interakcí na akumulaci anthokyaninů a proanthokyanidinů v bobulích červeného vína, *Vitis vinifera* druhu Cabernet Sauvignon. Ve studii byly srovnávány čtyři varianty ošetření révy vinné (s/bez světla, s/bez ethephonu). Světlo i ethephon zvýšily čerstvou hmotnost i sušinu slupek bobulí. Ale světlo ve srovnání s účinkem ethephonu více indukovalo akumulaci anthokyaninů a proanthokyanidinů. V této studii byly zvažovány možné interakce světla s účinkem ethephonu na biosyntézu endogenního ethylenu, respektive jeho down-regulace světlem, což mohlo mít za následek nižší obsah sekundárních metabolitů u révy ošetřené světlem a ethephonem. A tato zjištění poskytují nové informace o molekulární funkci ethylenu během vývoje bobulí a zajímavou informaci o možné interakci ethylenu a světla u révy vinné.⁴¹

Cannabis sativa je v dnešní době velice diskutovaná rostlina pro obsah mnoha terpenoidních sloučenin, zejména tetrahydrokanabinolu (THC) a kanabidiolu, s potenciálním terapeutickým užitím. Obsahuje však také významné množství karotenoidů a alfa-tokoferolu. Aktuální studie z tohoto roku prokázala až devítinásobné zvýšení obsahu THC po aplikaci 10 μ M ethephonu. Zároveň bylo prokázáno, že ethephon neměl negativní vliv na povrch listů a obsah chlorofylu a tak jeho použití může být vhodným způsobem pro zvýšení výnosu THC a alfa-tokoferolu v *Cannabis sativa L.* Tato studie též prokázala nižší obsah THC u rostlin, jež byly ošetřeny 100 μ M ethephonem, což ilustruje výše zmíněný nežádoucí účinek vyšších koncentrací ethephonu.³⁵

3.3.3 Inhibice stříbrnými ionty

Stříbrné ionty způsobují v rostlinách oxidativní stres. Jejich působení spouští v rostlinách obrannou reakci v podobě biosyntézy obranných proteinů a biosyntézu obranných sloučenin za účelem jejich detoxikace. Mohou inhibovat rostlinné enzymy, což bylo zjištěno zhruba u 70 enzymů a to například u hydroláz, oxidoreduktáz či transferáz. ⁴²

Dále tak může být ovlivněna biosyntéza sekundárních metabolitů, což bylo dokázáno například ve studii Hsieha a Grahama z roku 2010, kde byla potvrzena citlivost enzymu β -glukosidázy ovlivňujícího produkci izoflavonů v rostlině *Glycine max* vůči iontům stříbra. ⁴³

Stříbrné ionty mají například ve formě dusičnanu stříbrného schopnost inhibovat účinky ethylenu, což lze využít například při zpomalování dozrávání ovoce a zeleniny. Využívají se ke zkoumání role ethylenu v rostlinách či explantátových kulturách, jelikož stříbro ovlivňuje jeho biosyntézu u rostlin. ⁴²

Jiná studie z roku 2000 popisuje vliv inhibitoru ethylenu, AgNO_3 , na *in vitro* zakořeňování rostliny *Decalepis hamiltonii*. V této studii se sledovaly koncentrace ethylenu v kulturách *Decalepis hamiltonii* nejen po přidání stříbrných iontů, ale také po přidání ethephonu (prekurzor ethylenu) anebo jejich kombinace. Příliš velké koncentrace AgNO_3 vedly k inhibici proliferace kořenů, zatímco nižší koncentrace ji podporovaly. Bylo prokázáno, že použití inhibitoru ethylenu (AgNO_3), může podpořit tvorbu kořenů v rostlinných kulturách. Dále byla také prokázána efektivnost kombinace ethephonu a AgNO_3 na proliferaci kořenů. Stříbrné ionty mohou být tedy užitečnými doplňky médií pro *in vitro* zakořeňování rostlin. ⁴⁴

Dusičnan stříbrný také mimo jiné pravděpodobně zvyšuje hladinu kyseliny absicové. ⁴²

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.4 *Laboratorní pomůcky a technické vybavení*

Autokláv PS 20 A, Chirana

Analytické váhy PRLT A13, Sartorius

Box s laminárním prouděním Fatran LF

Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd

Filtrační papír

Alobalová fólie

Injekční stříkačka

Horkovzdušný sterilizátor SVS 91, Chirana

Laboratorní sklo

Mikrofiltry (0,22 μm)

Pipetovací balónek

Laboratorní třepačka Unimax

Těsnění na vialky, Labicom s.r.o.

Vialky, Labicom s.r.o.

Vodní lázeň 1042 GFL

Kapalinový chromatograf:

Autosampler AS-2055

Čerpadlo PU-2089

DAD detektor MD-2015

Předkolonový filtr

Kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5 μm) s ochranou předkolonkou

Termostat kolony Jetstream 2 Plus

3.5 Chemikálie

Ajatin plus- 10% roztok, Profarma-Produkt s.r.o., ČR

Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, ČR Ethanol 96%

Ethephon – SIGMA ALDRICH – USA

Methanol, Penta, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný monohydrát p.a., Lachema, ČR

Dusičnan amonný p.a., Penta, ČR

Dusičnan draselný p.a., Lachema, ČR

Edetan sodno - železnatý p.a., Sigma – Aldrich, USA

Ethanol 96%, Lachema, ČR

Glycin p.a., Penta, ČR

Hydrolyzát kaseinu, Imuna, SR

Chlorid kobaltnatý hexahydrát, Fluka, Švýcarsko

Chlorid vápenatý p.a., Penta, ČR

Jodid draselný p.a., Penta, ČR

Kyselina boritá p.a., Lachema, ČR

Kyselina fosforečná, Penta, ČR

Kyselina nikotinová, Sigma – Aldrich, USA

Kyselina α -naftyloctová, Sigma-Aldrich, USA

Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta, ČR

Myo-inositol, Sigma – Aldrich, USA

Pyridoxin, Sigma – Aldrich, USA

Sacharosa p.a., Lachema, ČR

Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR

Síran manganatý tetrahydrát p.a., Lachema, ČR

Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema, ČR
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Penta, ČR
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lachema, ČR
Biochanin-A p.a., Sigma, USA (Standard pro HPLC)
Daidzein p.a., Fluka, Švýcarsko (Standard pro HPLC)
Formononetin p.a., Fluka, Švýcarsko (Standard pro HPLC)
Genistein p.a., Sigma, USA (Standard pro HPLC)
Genistin p.a., Fluka, Švýcarsko (Standard pro HPLC)
Superčistá voda, Katedra analytické chemie FaFUK v HK, ČR
Thiamin, Sigma – Aldrich, USA

3.6 Kultivace tkáňových kultur

3.6.1 Rostlinný materiál

Tkáňová kultura pochází z kořenové části klíčící rostliny *Genista tinctoria*. Pro pokus byla použita kalusová a suspenzní kultura *Genista tinctoria*, 24. – 32. pasáž.

3.6.2 Příprava kultivačních nádob a nástrojů

Vysterilizované Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml se pro kalusové kultury naplnily můstkem z filtračního papíru a přidalo se 30 ml živného média. Pro suspenzní kultury se jen naplnily 30 ml živného média. Baňky se uzavřely alobalovou fólií a nechaly se vysterilizovat v autoklávu po dobu 20 minut, při 121°C a 100 kPa.

Laminární box se před použitím vydezinfikoval 96% ethanolem a nechal se vysvítit germicidní zářivkou. Při práci se dodržovaly aseptické podmínky.

Pinzety používané k pasážování, byly umyté a opláchnuté 96% ethanolem. Poté se zabalily do alobalové fólie a nechaly se vysterilizovat v horkovzdušném sterilizátoru po dobu 2 hodin při 200°C.

3.6.3 Živné médium- SH

Pro kultivaci kalusové i suspenzní kultury *Genista tinctoria* se použilo živné médium dle Murashigeho a Skooga spolu s 1 ml růstového regulátoru α -naftyloctové kyseliny (α -NAA v koncentraci 1g/100 ml).

3.6.3.1 Složení živného média (v mg/l):⁴⁵

Makroelementy:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 440,000

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 170,000

KNO_3 – 1900,000

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 370,000

NH_4NO_3 – 1650,000

Mikroelementy:

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025

H_3BO_3 – 6,200

KI – 0,830

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 27,840

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,250

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 11,500

Železnatý komplex:

Na_2EDTA – 37,340

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,840

Vitamíny

Kyselina nikotinová – 0,500

Pyridoxin – 0,500

Thiamin – 0,100

Další organické sloučeniny:

Hydrolyzát kaseinu – 1000,000

Myo-inositol – 100,000

Sacharóza – 30000,000

Glycin – 2,000

3.6.3.2 Příprava živného média

Tekuté složky se pomocí pipety kvantitativně přenesly v předepsaném množství do odměrné baňky (1 l) a zředily se destilovanou vodou na 500 ml. Dovážily se pevné látky, rovněž v předepsaném množství a odměrná baňka se destilovanou vodou doplnila po značku. Po důkladném rozpuštění všech složek, se médiem plnily po 30 ml Erlenmeyerovy baňky. Po uzavření Erlenmeyerových baněk alobalovou fólií následovala jejich sterilizace v autoklávu (20 min, 121°C, 100 kPa).

3.6.4 Pasážování a kultivace

Kalusové kultury byly získány pasážováním, tedy přenesením tkáňové kultury na čerstvé živné médium. Pasážování se provádělo v laminárním boxu, přenosem inokula na můstek z filtračního papíru umístěného v Erlenmeyerových baňkách s živným médiem. Ty se poté nechaly kultivovat 17dní v kultivační místnosti při světelném režimu 16 hodin světlo, 8 hodin tma a při 25°C.

Suspenní kultury byly připraveny z narostlých kalusů a to tak, že se inokula rozmělnily o stěny baňky, ve které bylo též živné médium. Tyto baňky se pak nechaly kultivovat na třepačce (115 otáček/min.) z důvodu provzdušnění, v kultivační místnosti za stejných podmínek, po dobu 2 týdnů.

3.7 Příprava elicitoru

Jako elicitor byl zvolen ethephon. Každý pokus se prováděl ve třech koncentracích, které se připravily následujícím způsobem.

Roztok o koncentraci C1 byl připraven rozpuštěním 100 mg ethephonu ve 100 ml ethanolu. Roztok o koncentraci C2 se připravil naředěním roztoku C1, ze kterého se pomocí pipety odebralo 10 ml roztoku do odměrné baňky, která se doplnila ethanolom do 100 ml. Naředěním se připravil i roztok koncentrace C3 a to tak, že se odebral opět z roztoku o koncentraci C1 1 ml do odměrné baňky, která se doplnila ethanolom do 100 ml.

Ředění roztoků ethephonu probíhalo za aseptických podmínek, s použitím vysterilizovaného laboratorního skla.

Přehled koncentrací připravených roztoků ethephonu:

C1 (100 mg/100 ml) - 7 000 μM

C2 (10 mg/100 ml) - 700 μM

C3 (1 mg/100 ml) - 70 μM

3.8 Příprava inhibitoru

Pro inhibici ethephonu se používaly stříbrné ionty ve formě dusičnanu stříbrného (AgNO_3) v koncentraci 120 μM .

Připravil se nejprve zásobní roztok AgNO_3 , který měl 100x silnější koncentraci než roztok požadovaný. Z něj se pak v čas potřeby ředil roztok AgNO_3 o koncentraci 120 μM , odpipetováním 1 ml zásobního roztoku do odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou do 100 ml.

3.9 Elicitace

Ke každému pokusu bylo použito 50 baněk s narostlou kalusovou či suspenzní kulturou. Veškerá práce se prováděla v laminárním boxu, který byl předem vydezinfikován Ajatinem plus 10% a vysvícen minimálně po dobu 30 minut germicidní zářivkou. Použité nástroje byly vysterilizovány a baňky před další manipulací otřeny 96% ethanolem.

Do 20 baněk se napipetoval 1 ml ethephonu. Do 15 baněk byla napipetována obdobným způsobem směs 1 ml ethephonu a 1 ml dusičnanu stříbrného. Dalších 15 baněk sloužilo pro kontrolu a byl do nich přidán jen 1 ml 60% ethanolu. Baňky se umístily zpět do kultivační místnosti (suspenzní kultury opět na třepačku – 115 otáček/min.) a následovaly odběry vzorků v časových intervalech po 24, 48, 72, 96 a 168 hodinách.

3.9.1 Provedení odběrů vzorků u kalusových kultur:

50 baněk s narostlou kalusovou kulturou bylo rozděleno v rámci jedné použité koncentrace ethephonu dle časových intervalů do 5 skupin. Každá skupina obsahovala daný počet baněk (viz tabulka 1)

Odebíraly se tři druhy vzorků:

1. kalusy, ke kterým byl přidán ethephon (4 baňky)
2. kalusy, ke kterým byla přidána směs ethephonu a dusičnanu stříbrného (3 baňky)
3. kalusy, které sloužily jako kontrola, obsahující 1 ml 60% ethanolu (3 baňky)

Odebrané kalusy se pomocí pinzety umístily na předem označený filtrační papír, na kterém se nechaly při pokojové teplotě uschnout. Takto byly připraveny pro další stanovení.

Živné médium všech baněk daného typu vzorku se smíchalo dohromady a vzorek této směsi se nechal zmrazit pro další analýzu.

3.9.2 Provedení odběrů vzorků u suspenzních kultur:

Postup byl obdobný jako u kalusových kultur s tím rozdílem, že se suspenze přefiltrovaly přes filtrační papír. Filtrační papíry se nechaly i s jejich obsahem uschnout při pokojové teplotě a přefiltrovaná média se opět nechala zmrazit.

Tabulka 1: Přehled počtu baněk pro daný časový interval

Přidávané látky	Odběr po 24hod.	Odběr po 48 hod.	Odběr po 72 hod.	Odběr po 96 hod.	Odběr po 168 hod.
Ethephon	4	4	4	4	4
Ethephon+AgNO ₃	3	3	3	3	3
Kontrola (ethanol)	3	3	3	3	3

3.10 Stanovení obsahu izoflavonoidů

Obsah izoflavonoidů byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Před stanovením bylo nutné provést následující úpravu vzorků.

3.10.1 Úprava usušených vzorků z kalusových a suspenzních kultur

Usušené vzorky se rozdrtily v třecí misce a poté zvážily na analytických vahách na tři desetinná místa. Dále se kvantitativně přenesly do varných baněk a zalily se 10 ml methanolu 80%. Po umístění na vodní lázeň se 20 minut extrahovaly pod zpětným chladičem. Baňky se nechaly zchladnout a výluh se přefiltroval přes chomáček vaty do 25 ml odměrné baňky. Následovala stejným způsobem i druhá extrakce a oba výluhy se v odměrné baňce smíchaly a doplnily 80% methanolem po rysku. Injekční stříkačkou se odebralo 1,7 ml výluhu a přes mikrofiltr (0,22 μm) se jím naplnily předem označené vialky.

3.10.2 Úprava vzorků s živnými médii

Jednotlivé vzorky byly po rozmražení odpařeny na vodní lázni do sucha. K odparku se přidalo 25 ml 80% methanolu a odparek se nechal rozpustit. 1,7 ml tohoto roztoku se opět pomocí injekční stříkačky převedlo přes mikrofiltr do předem označených vialek. Takto byly vzorky připravené pro analýzu HPLC.

3.10.3 HPLC analýza

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je často používaná analytická separační metoda, která umožňuje současně kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, s vysokou citlivostí.⁴⁶

HPLC analýza se u připravených vzorků prováděla na chromatografické sestavě Jasco. Eluce mobilní fáze probíhala nejprve gradientově, poté izokraticky. Jako pufr pro mobilní fázi se vždy použila 0,15% kyselina fosforečná. Obsah stanovovaných izoflavonoidů byl vypočten z píků při vlnové délce 260 nm.

Přehled parametrů HPLC analýzy:

Chromatograf: sestava Jasco

Čerpadlo: PU 2089

Autosampler: AS- 2055

Kolona: kolona LiChrospher RP – 18250 x 4, sorbent LiChrospher 5 μm , předkolonový filtr, ochranná předkolonka

Objem nástřiku: 20 μl

Detekce: DAD detektor MD – 2015, $\lambda = 190 - 450 \text{ nm}$, vyhodnoceno při 260 nm

Mobilní fáze: methanolický roztok 0,15% H_3PO_4

Eluční profil: *gradientová eluce*- z 30% methanolu v čase $t=0$ do 80% methanolu v čase $t=9 \text{ min.}$, *isokratická eluce*- 80% methanolem do času $t=15 \text{ min.}$

Standardy: genistin, daidzein, genistein, formononetin, biochanin A

Průtok: 1,1 ml/min

3.11 Kalibrační křivky

Kalibrační křivky byly sestaveny podle rovnice: $y = bx + a$

Koeficient regrese = 0,9999

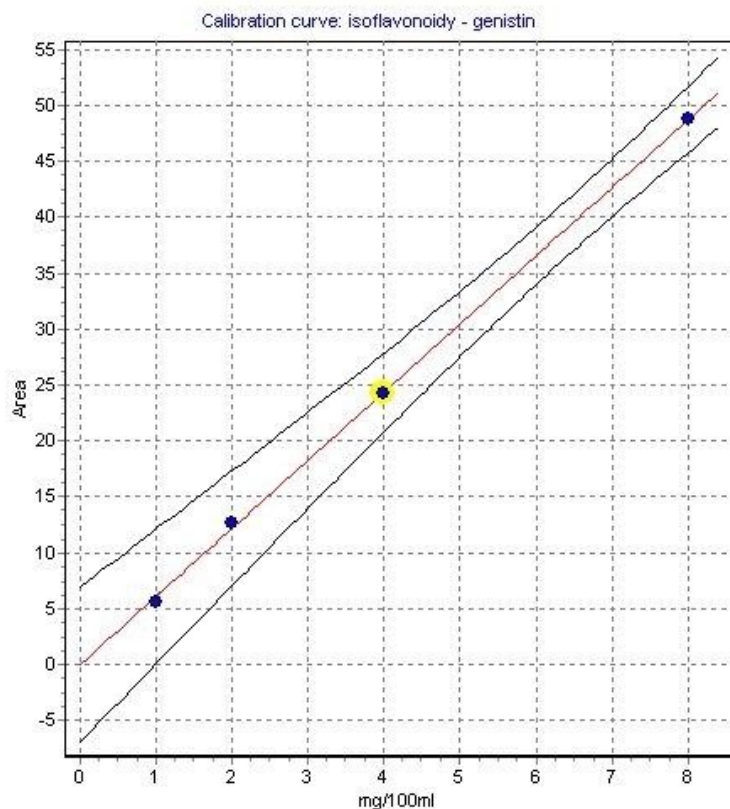
x = koncentrace v mg/100ml

y = plocha

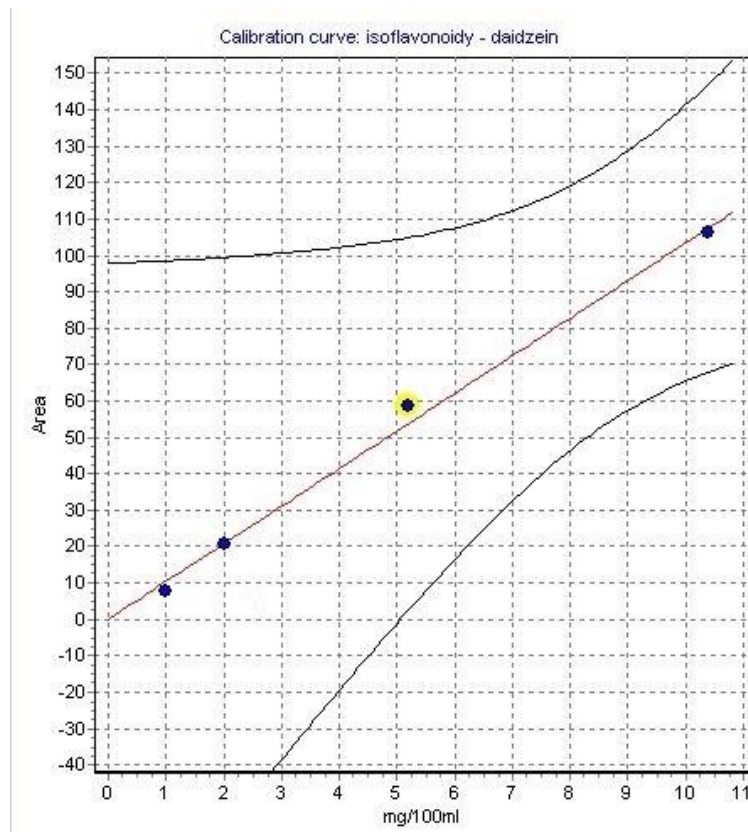
a = 0

b = různé hodnoty podle konkrétních izoflavonoidů

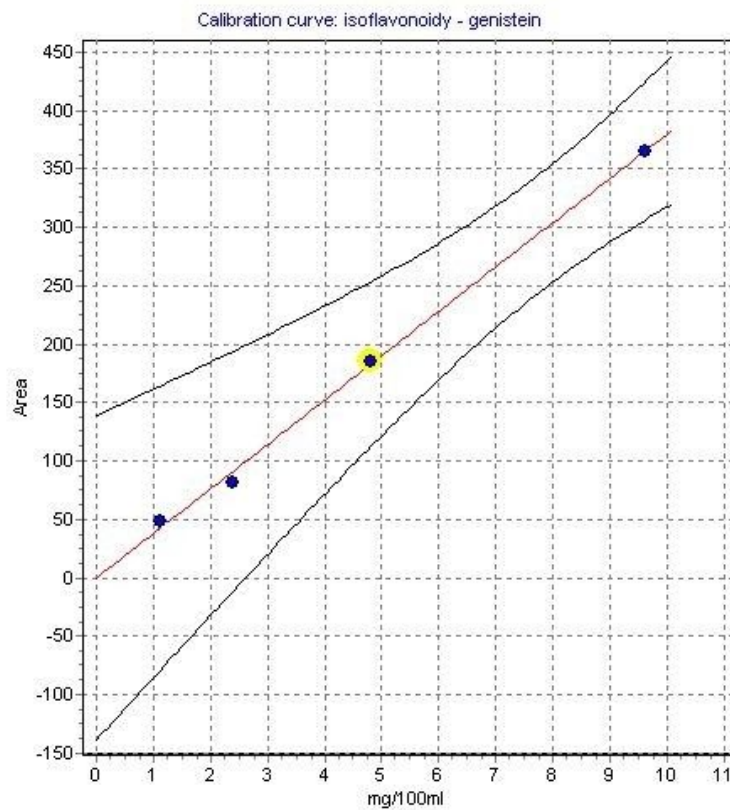
Obrázek 8: Kalibrační křivka genistinu



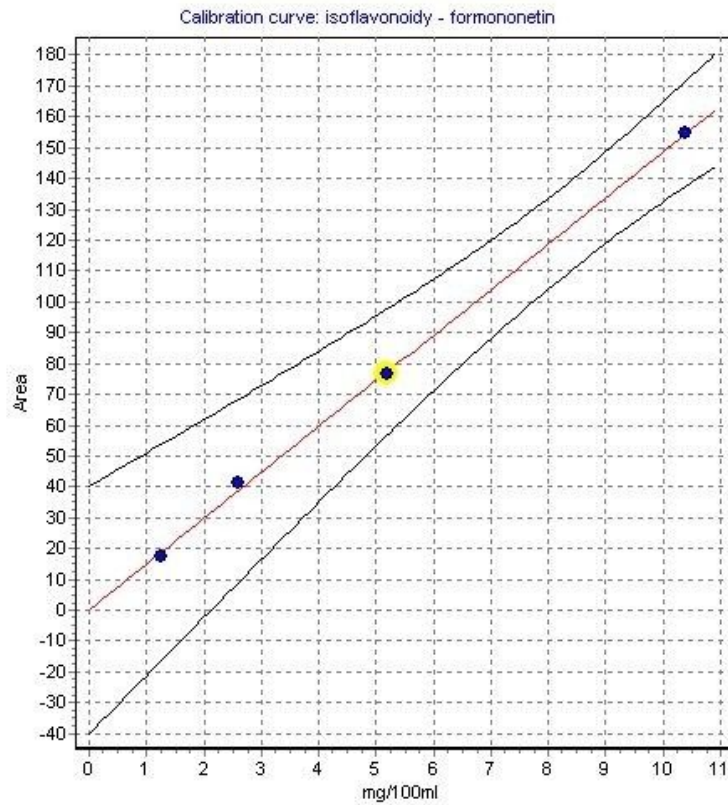
Obrázek 9: Kalibrační křivka daidzeinu



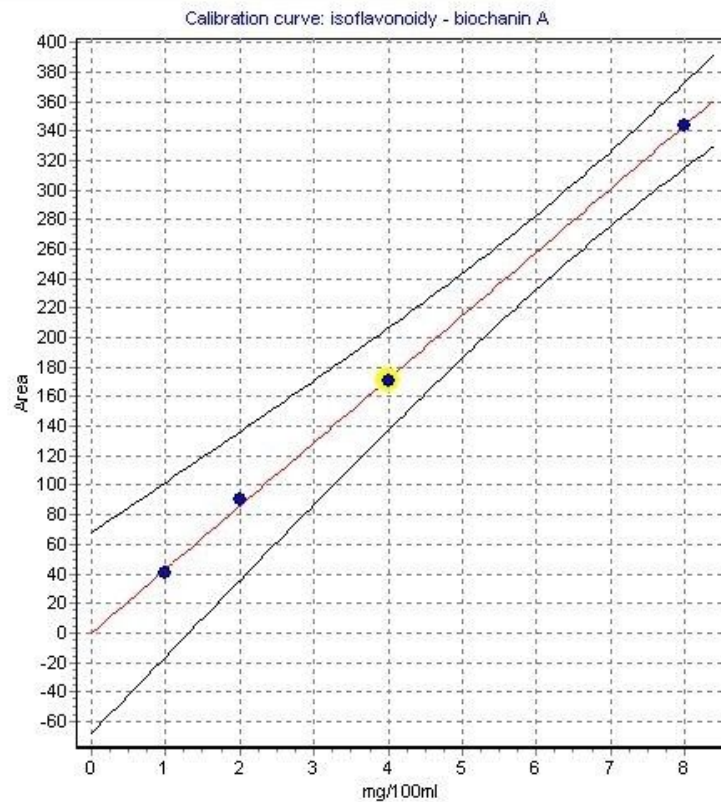
Obrázek 10: Kalibrační křivka genisteinu



Obrázek 11: Kalibrační křivka formononetinu

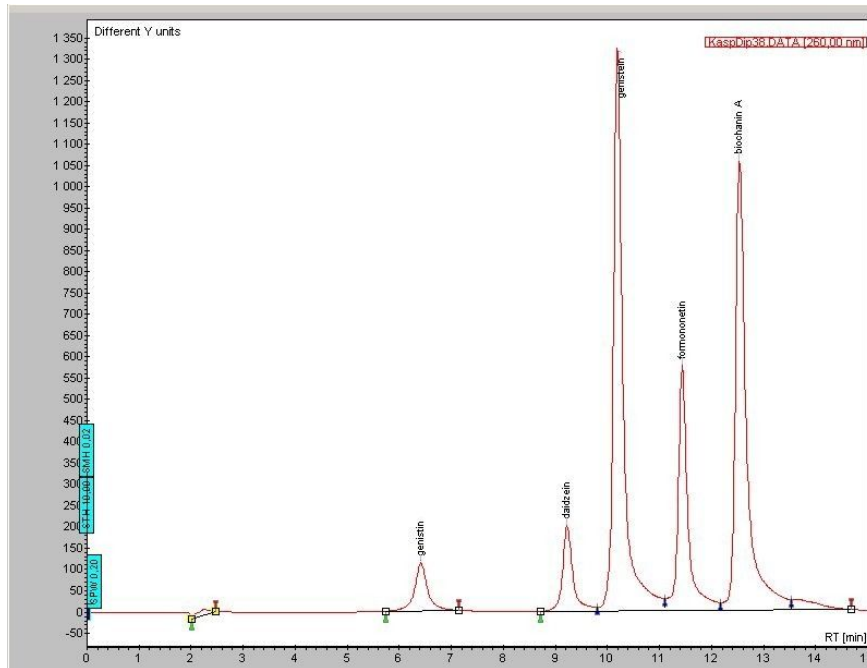


Obrázek 12: Kalibrační křivka biochaninu A



3.12 Chromatogram standardů izoflavonoidů

Obrázek 13: Chromatogram standardů



Uvedený chromatogram zobrazuje použité standardy pro HPLC analýzu. Dle vzrůstajících retenčních časů mají standardy následující pořadí: genistein, daidzein, genistein, formononetin a biochanin A.

3.13 Statistické zpracování dat^{47, 48}

3.13.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr značí součet všech naměřených hodnot, který je vydělen jejich počtem. Vypočítá se podle vzorce:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

\bar{x} = aritmetický průměr

n = počet hodnot v souboru

x_i = naměřená hodnota

3.13.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka určuje míru odchýlení naměřených hodnot od hodnot průměrných. Vypočítá se podle vzorce:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

s = směrodatná odchylka

n = počet hodnot v souboru

\bar{x} = aritmetický průměr

x_i = naměřená hodnota

3.13.3 T – test (též „studentův test“)

T – test slouží k celkovému zhodnocení výsledků a zohledňuje statistickou významnost rozdílu dvou průměrů. Vypočítá se podle vzorce:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

\bar{x}_1 = aritmetický průměr pokusného souboru

\bar{x}_2 = aritmetický průměr kontrolního souboru

n_1 = počet členů pokusného souboru

n_2 = počet členů kontrolního souboru

s_1 = směrodatná odchylka pokusného souboru

s_2 = směrodatná odchylka kontrolního souboru

t = testovací kritérium

Stupeň volnosti pro testovací kritérium t se vypočítal dle vzorce: $v = n_1 + n_2 - 2$. Počet členů pokusného i kontrolního souboru je vždy $n_1 = n_2 = 3$. Stupeň volnosti (v) je tedy 4. Zvolenou hladinou významnosti byla $p = 0,05$. Při této hladině významnosti a stupni volnosti je kritická hodnota $T_p(v)$ 2,78.

V případě, že je vypočítaná hodnota testovacího kritéria t větší než kritická hodnota $T_p(v)$ pro daný stupeň volnosti, je rozdíl hodnot $x_1 - x_2$ považován za statisticky významný.

4. VÝSLEDKY

Výsledné hodnoty jsou průměrem tří stanovení.

Používané zkratky v tabulkách a grafech:

DW = dry weight – sušina

E = ethephon

E+A = ethephon v kombinaci s inhibitorem AgNO_3

K = kontrola

GE = genistin

DA = daidzein

GEN = genistein

FO = formononetin

BA = biochanin A

C1 = koncentrace roztoku ethephonu 100 mg/100ml (7000 μM)

C2 = koncentrace roztoku ethephonu 10 mg/100ml (700 μM)

C3 = koncentrace roztoku ethephonu 1 mg/100ml (70 μM)

Statisticky významné hodnoty jsou v tabulkách vyznačeny **tučně**.

Zvýšené statisticky významné hodnoty jsou v tabulkách vyznačeny barevně.



4.1 Vliv ethephonu a ethephonu s AgNO₃ na produkci izoflavonoidů v kalusové kultuře v různých koncentracích

Tabulka 2: Koncentrace C1 – 7000 μM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/g DW)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	0,80	0,50	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	-13,00	-149,00	0	-2,83	0
	E+A	0,20	0	0	0,20	0	0,10	0	0	0,10	0	-19,00	-217,79	0	0	0
	K	2,10	15,40	0	0,20	0	0,10	0,10	0	0,10	0	-	-	-	-	-
48	E	0	1,60	0	0	0	0	0,10	0	0	0	-31,11	22,63	0	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-31,11	0	0	0	0
	K	2,20	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	-	-	-	-	-
72	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-25,46	-280,01	0	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-25,46	-280,01	0	0	0
	K	1,80	19,80	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	-	-	-	-	-
96	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-8,49	0	0	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-8,49	0	0	0	0
	K	0,60	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	-	-	-	-	-
168	E	0	0	0	0,20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,83	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-

Tabulka 3: Koncentrace C2 – 700 μM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/g DW)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	4,30	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	22,00	0	0	-2,83	0
	E+A	18,60	1,80	8,10	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	165,00	-136,00	114,55	-2,83	0
	K	2,10	15,40	0	0,20	0	0,10	0,10	0	0,10	0	-	-	-	-	-
48	E	3,20	35,40	0	0,20	0	0,10	0,10	0	0,10	0	10,00	500,63	0	2,83	0
	E+A	0,90	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	-13,00	0	0	0	0
	K	2,20	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	-	-	-	-	-
72	E	4,10	38,20	0	0,20	0	0,10	0,10	0	0,10	0	23,00	184,00	0	2,83	0
	E+A	1,10	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	-7,00	-280,01	0	0	0
	K	1,80	19,80	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	-	-	-	-	-
96	E	3,50	45,10	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	29,00	637,81	0	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-8,49	0	0	0	0
	K	0,60	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	-	-	-	-	-
168	E	2,10	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	29,70	0	0	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-

Tabulka 4: Koncentrace C3 – 70 μM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/g DW)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2,83	0
	E+A	1,50	34,30	3,90	0	0,20	0,10	0,10	0,10	0	0,10	21,21	485,08	55,16	-2,83	2,83
	K	0	0	0	0,20	0	0	0	0	0	0,10	-	-	-	-	-
48	E	0,70	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	9,90	0	0	0	0
	E+A	1,10	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	15,56	0	0	0	0
	K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
72	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-12,73	0	0	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-12,73	0	0	0	0
	K	0,90	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	-	-	-	-	-
96	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E+A	0,80	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	11,31	0	0	0	0
	K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
168	E	1,90	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	26,87	0	0	-2,83	0
	E+A	8,90	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	125,87	0	0	-2,83	0
	K	0	0	0	0,20	0	0	0	0	0,10	0	-	-	-	-	-

4.2 Vylučování izoflavonoidů do média kalusové kultury po aplikaci ethephonu a ethephonu s AgNO₃ v různých koncentracích

Tabulka 5: Koncentrace C1 – 7000 µM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/100ml)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	4,04	3,48	2,19	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	15,22	27,95	30,04	0	0
	E+A	1,20	2,31	0,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-8,83	16,75	2,73	0	0
	K	2,09	0,61	0,01	0	0	0,10	0,10	0	0	0	-	-	-	-	-
48	E	3,41	1,09	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	-7,88	-15,92	-15,47	0	0
	E+A	1,80	2,70	2,29	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-23,99	0	11,63	0	0
	K	4,21	2,70	1,11	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
72	E	2,40	2,27	1,01	0	0	0,10	0,06	0,10	0	0	-42,00	-4,95	0	0	0
	E+A	1,40	5,51	0,81	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-52,00	27,57	-1,89	0	0
	K	6,60	2,68	1,00	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
96	E	2,00	5,20	2,31	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-3,96	5,06	11,02	0	0
	E+A	1,40	1,10	2,08	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-9,96	-35,11	8,68	0	0
	K	2,40	4,68	1,19	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
168	E	3,70	2,31	4,60	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-9,01	4,05	17,90	0	0
	E+A	2,10	8,21	2,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-24,80	62,63	-5,06	0	0
	K	4,61	1,90	2,80	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-

Tabulka 6: Koncentrace C2 – 700 µM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/100ml)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	2,60	3,20	0,10	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	5,06	-25,71	1,36	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-29,12	8,50	0	0	0
	K	2,09	0,61	0,01	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
48	E	1,40	2,20	0,50	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-27,97	-5,00	-6,05	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-59,10	-38,18	-15,47	0	0
	K	4,21	2,70	1,11	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
72	E	1,20	8,40	0,60	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-54,00	56,01	-3,96	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-93,34	-36,46	-14,07	0	0
	K	6,60	2,68	1,00	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
96	E	3,30	9,80	0,50	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	9,03	50,13	-6,78	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-33,84	-63,63	-16,35	0	0
	K	2,40	4,68	1,19	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
168	E	2,50	2,40	2,10	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-20,86	5,00	-7,03	0	0
	E+A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-63,57	-26,87	-39,58	0	0
	K	4,61	1,90	2,80	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-

Tabulka 7: Koncentrace C3 – 70 µM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/100ml)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	0,90	1,50	0,19	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-10,00	-35,77	-14,99	0	0
	E+A	1,10	5,61	1,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-8,00	4,93	-4,00	0	0
	K	1,90	5,11	1,70	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
48	E	2,61	2,90	2,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-14,67	17,00	16,99	0	0
	E+A	2,91	0,80	1,41	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-11,81	-3,96	9,05	0	0
	K	4,10	1,20	0,49	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
72	E	3,80	3,20	1,48	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-31,86	-9,00	11,59	0	0
	E+A	2,11	5,00	0	0	0	0,10	0,10	0,00	0	0	-48,28	8,96	-4,24	0	0
	K	7,01	4,10	0,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
96	E	2,80	3,39	0,40	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-28,00	-32,68	-3,96	0	0
	E+A	1,90	2,40	1,00	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-37,00	-42,79	2,03	0	0
	K	5,60	6,69	0,80	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
168	E	2,70	2,81	0,38	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-4,00	-10,72	-7,07	0	0
	E+A	5,59	4,58	0,39	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	24,85	6,48	-7,09	0	0
	K	3,10	3,91	1,11	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-

4.3 Vliv ethephonu a ethephonu s AgNO₃ na produkci izoflavonoidů v suspenzní kultuře v různých koncentracích

Tabulka 8: Koncentrace C1 – 7000 μM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/g DW)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	8,00	0	0,20	0	0	0,10	0	0,10	0	0	71,00	-8,49	2,83	0	0
	E+A	0	0,60	0	0	0	0	0,10	0	0	0	-12,73	0	0	0	0
	K	0,90	0,60	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	-	-	-	-	-
48	E	8,90	0,20	0,20	0,20	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	75,00	0	-1,00	0	0
	E+A	5,40	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	40,00	-2,83	-4,24	-2,83	0
	K	1,40	0,20	0,30	0,20	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	-	-	-	-	-
72	E	0,90	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	-88,00	-5,66	-8,49	-2,83	0
	E+A	1,40	0,60	0,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-83,00	2,00	-3,00	-2,83	0
	K	9,70	0,40	0,60	0,20	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	-	-	-	-	-
96	E	10,30	0,30	0,20	0,20	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	22,00	-3,00	-3,00	2,83	0
	E+A	7,20	0,20	0,30	0,20	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	-9,00	-4,00	-2,00	2,83	0
	K	8,10	0,60	0,50	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
168	E	7,40	0,30	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	8,00	4,24	0	-4,24	0
	E+A	3,30	0,40	0,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-33,00	5,66	2,83	-4,24	0
	K	6,60	0	0	0,30	0	0,10	0	0	0,10	0	-	-	-	-	-

Tabulka 9: Koncentrace C2 – 700 μM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/g DW)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	2,70	0,20	0,40	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	18,00	-4,00	5,66	0	0
	E+A	1,30	0,60	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	4,00	0	0	0	0
	K	0,90	0,60	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	-	-	-	-	-
48	E	3,50	0,40	0,20	0,20	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	21,00	2,00	-1,00	0	0
	E+A	6,50	0,30	0,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	51,00	1,00	0	-2,83	0
	K	1,40	0,20	0,30	0,20	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	-	-	-	-	-
72	E	8,30	0,30	0,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-14,00	-1,00	-4,00	-2,83	0
	E+A	4,70	0,30	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	-50,00	-1,00	-8,49	-2,83	0
	K	9,70	0,40	0,60	0,20	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	-	-	-	-	-
96	E	17,30	0,20	0,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	92,00	-4,00	-3,00	0	0
	E+A	2,60	0,40	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	-55,00	-2,00	-7,07	0	0
	K	8,10	0,60	0,50	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
168	E	0,70	0,30	0,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-59,00	4,24	4,24	-4,24	0
	E+A	0,90	0,30	0,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-57,00	4,24	2,83	-4,24	0
	K	6,60	0	0	0,30	0	0,10	0	0	0,10	0	-	-	-	-	-

Tabulka 10: Koncentrace C3 – 70 μM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/g DW)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	14,20	0,50	0,40	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	130,00	-1,00	-1,00	0	0
	E+A	1,30	0,90	0,50	0,20	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	1,00	3,00	0	2,83	0
	K	1,20	0,60	0,50	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
48	E	2,70	0,40	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	14,00	-18,00	-16,97	-5,66	0
	E+A	2,00	0,40	0,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	7,00	-18,00	-10,00	-5,66	0
	K	1,30	2,20	1,20	0,40	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	-	-	-	-	0
72	E	10,70	1,30	0,60	0,30	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	96,00	8,00	3,00	4,24	0
	E+A	9,40	0,30	0	0	0	0,10	0,10	0	0	0	83,00	-2,00	-4,24	0	0
	K	1,10	0,50	0,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
96	E	6,20	0,20	0,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	43,00	0	0	0	0
	E+A	2,70	0,50	0,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	8,00	3,00	1,00	0	0
	K	1,90	0,20	0,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
168	E	3,70	0,40	0,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	52,33	0	1,00	0	0
	E+A	1,50	0,50	0,40	0,30	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0	21,21	1,00	2,00	4,24	0
	K	0	0,40	0,20	0	0	0	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-

4.4 Vylučování izoflavonoidů do média suspenzní kultury po aplikaci ethephonu a ethephonu s AgNO₃ v různých koncentracích

Tabulka 11: Koncentrace C1 – 7000 µM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/100ml)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	1,87	1,83	0,82	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	12,40	11,20	0	0	0
	E+A	0,39	7,61	2,12	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-2,40	69,00	13,00	0	0
	K	0,63	0,71	0,82	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
48	E	0,17	0	0,48	0	0	0,10	0	0,10	0	0	0,90	-51,34	8,00	0	0
	E+A	0,52	0,98	0,72	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	4,40	-26,50	5,60	0	0
	K	0,08	3,63	1,28	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
72	E	2,50	0,83	1,50	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	21,90	-4,40	11,30	0	0
	E+A	0,47	1,93	0,34	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	1,60	6,60	-0,30	0	0
	K	0,31	1,27	0,37	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
96	E	0,64	0,22	1,10	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	2,60	-8,40	-3,80	0	0
	E+A	0,34	1,46	0,88	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-0,40	4,00	-6,00	0	0
	K	0,38	1,06	1,48	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
168	E	2,08	7,07	0,37	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	13,40	65,40	1,60	0	0
	E+A	0,52	0,16	0,12	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-2,20	3,70	-0,90	0	0
	K	0,74	0,53	0,21	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-

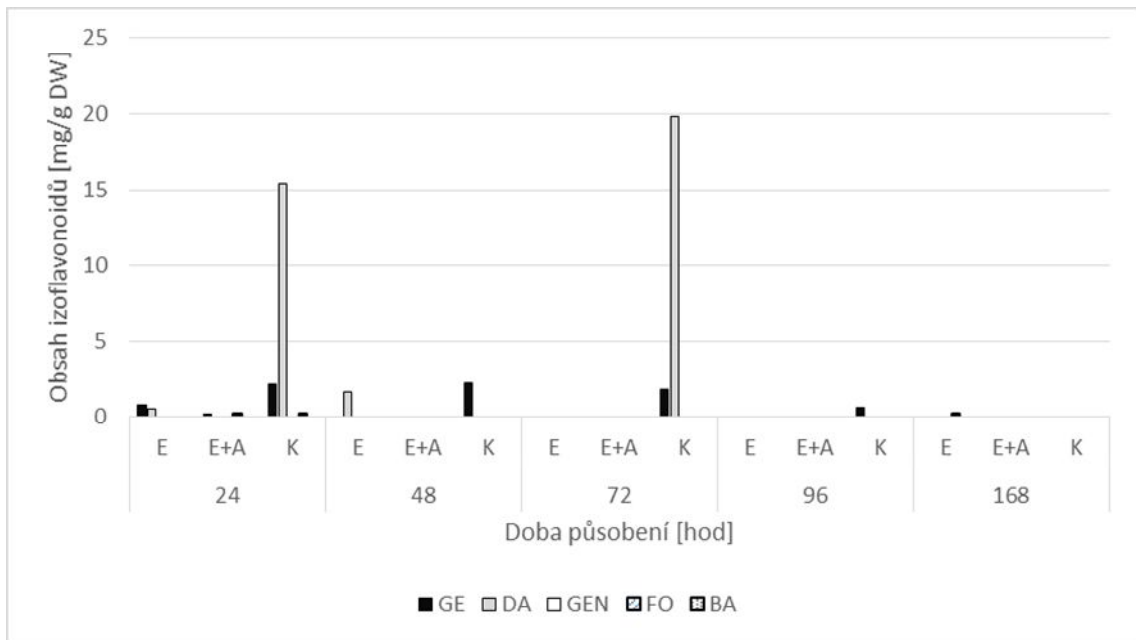
Tabulka 12: Koncentrace C2 - 700 µM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/100ml)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	3,02	0,48	2,14	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	23,90	-2,30	13,20	0	0
	E+A	4,51	0,04	0,02	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	38,80	-6,70	-8,00	0	0
	K	0,63	0,71	0,82	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
48	E	0,21	0,64	0,68	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	1,30	-29,90	-6,00	0	0
	E+A	0,57	0,67	0,46	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	4,90	-29,60	-8,20	0	0
	K	0,08	3,63	1,28	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
72	E	1,21	2,44	0,12	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	9,00	11,70	-2,50	0	0
	E+A	1,06	0,38	0,09	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	7,50	-8,90	-2,80	0	0
	K	0,31	1,27	0,37	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
96	E	2,07	2,20	0,08	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	16,90	11,40	-14,00	0	0
	E+A	1,11	0,89	0,19	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	7,30	-1,70	-12,90	0	0
	K	0,38	1,06	1,48	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
168	E	3,91	2,36	1,09	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	31,70	18,30	8,80	0	0
	E+A	1,80	0,17	0,58	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	10,60	-3,60	3,70	0	0
	K	0,74	0,53	0,21	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-

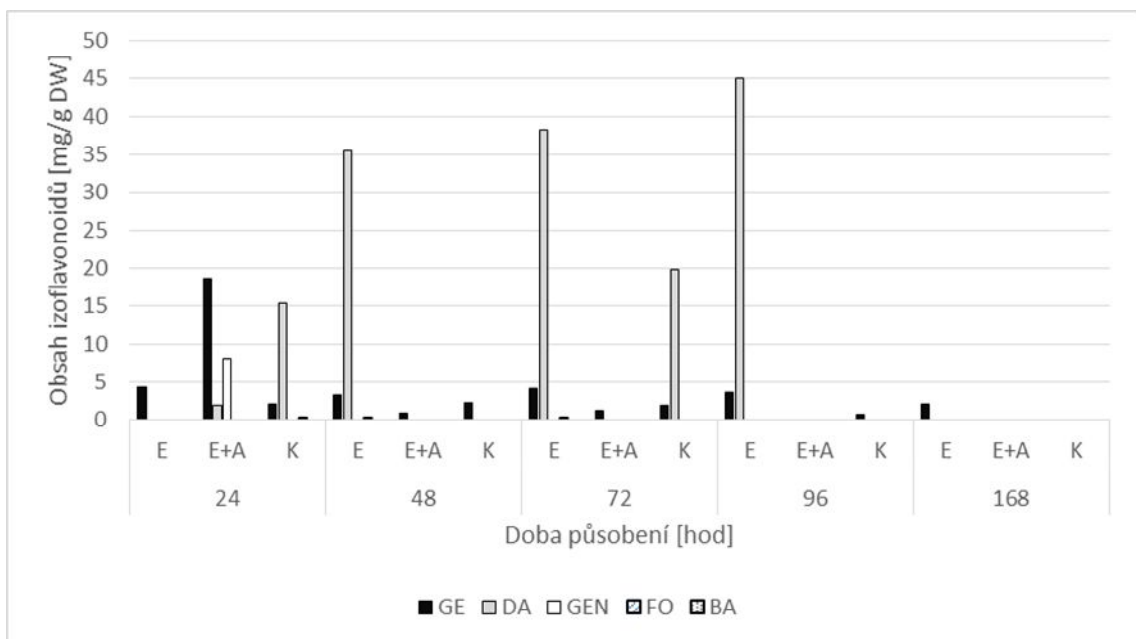
Tabulka 13: Koncentrace C3-70 µM

Doba působení (hod)	Elicitor [mg/ml]	Průměrný obsah (mg/100ml)					Směrodatná odchylka					T-test				
		GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA	GE	DA	GEN	FO	BA
24	E	2,39	0,16	0,51	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	22,70	-28,80	-1,70	0	0
	E+A	0,83	1,06	0,30	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	7,10	-19,80	-3,80	0	0
	K	0,12	3,04	0,68	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
48	E	4,01	2,54	0,26	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	31,40	3,90	-16,60	0	0
	E+A	0,23	0,04	0,50	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-6,40	-21,10	-14,20	0	0
	K	0,87	2,15	1,92	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
72	E	1,13	0,17	0,57	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-66,10	-0,10	-11,10	0	0
	E+A	0,29	0,33	0,32	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-74,50	1,50	-13,60	0	0
	K	7,74	0,18	1,68	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
96	E	1,77	0,05	0,94	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-16,30	-20,90	1,60	0	0
	E+A	1,48	1,20	0,91	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-19,20	-9,40	1,30	0	0
	K	3,40	2,14	0,78	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-
168	E	0,49	0,46	0,53	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-0,40	1,10	4,30	0	0
	E+A	2,96	0,27	1,56	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	24,30	-0,80	14,60	0	0
	K	0,53	0,35	0,10	0	0	0,10	0,10	0,10	0	0	-	-	-	-	-

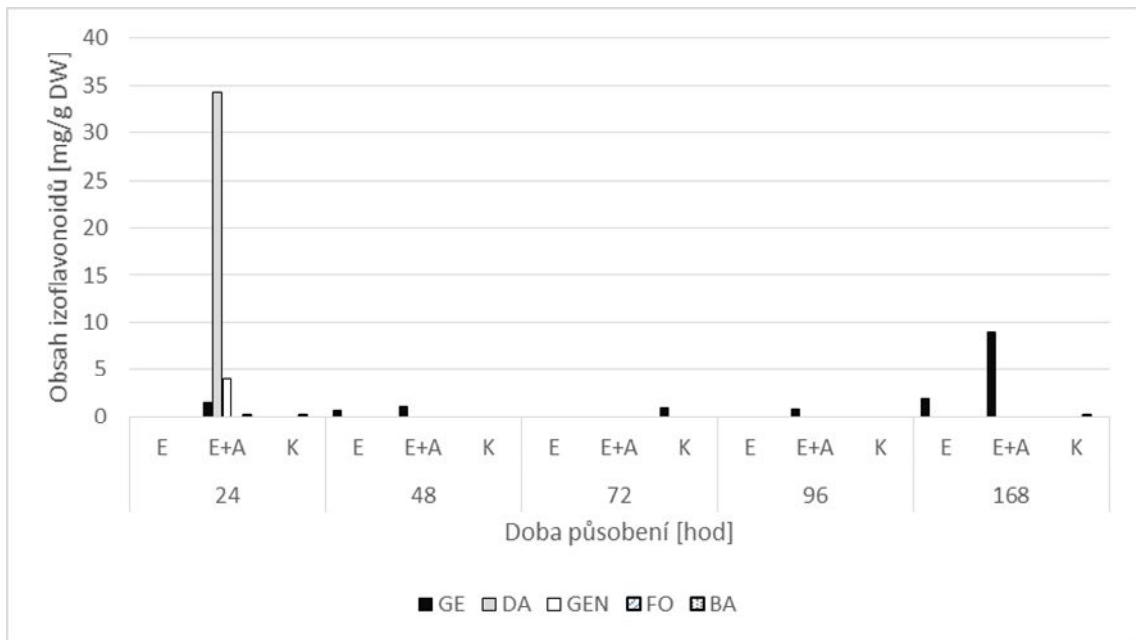
Graf 1: Produkce izoflavonoidů v kalusové kultuře po aplikaci elicitorů
v koncentraci 7000 μM



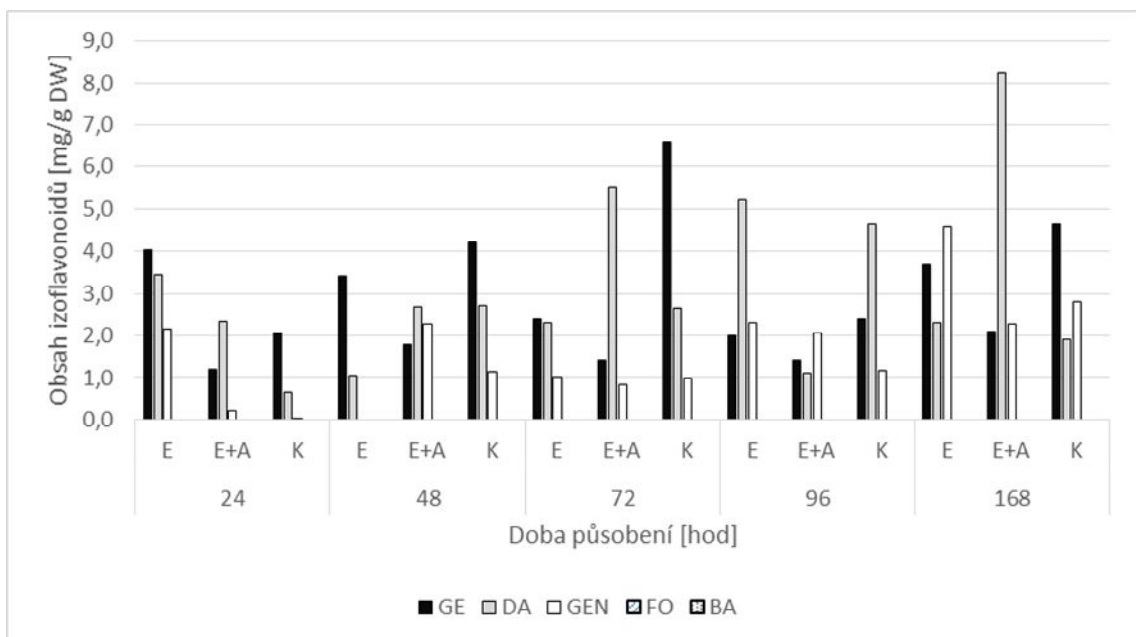
Graf 2: Produkce izoflavonoidů v kalusové kultuře po aplikaci elicitorů
v koncentraci 700 μM



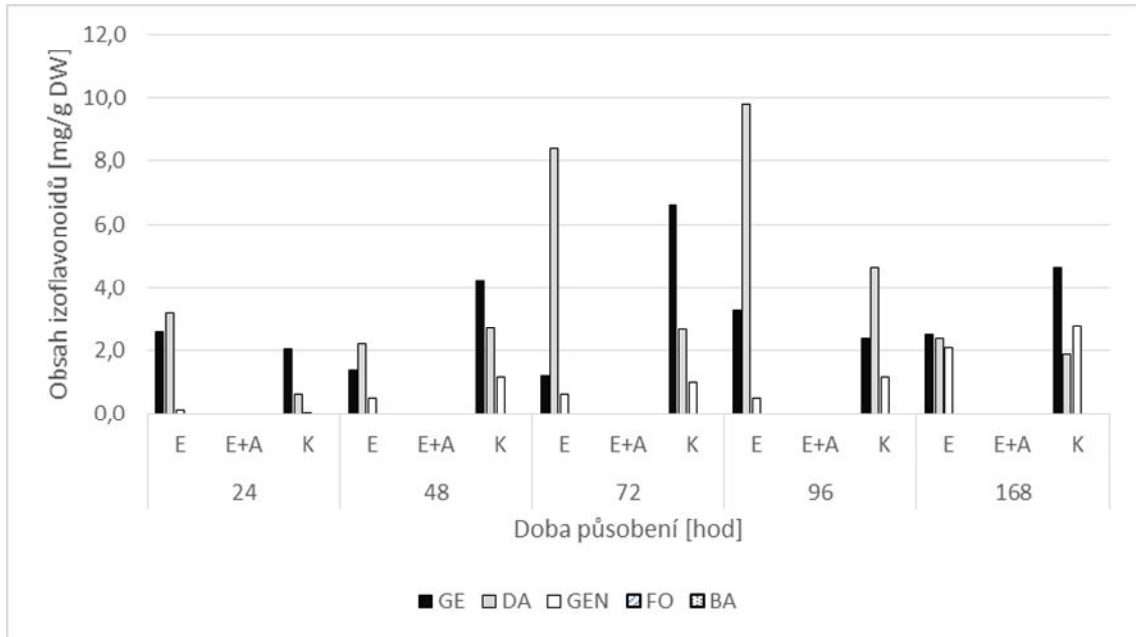
Graf 3: Produkce izoflavonoidů v kalusové kultuře po aplikaci elicitorů
v koncentraci 70 μM



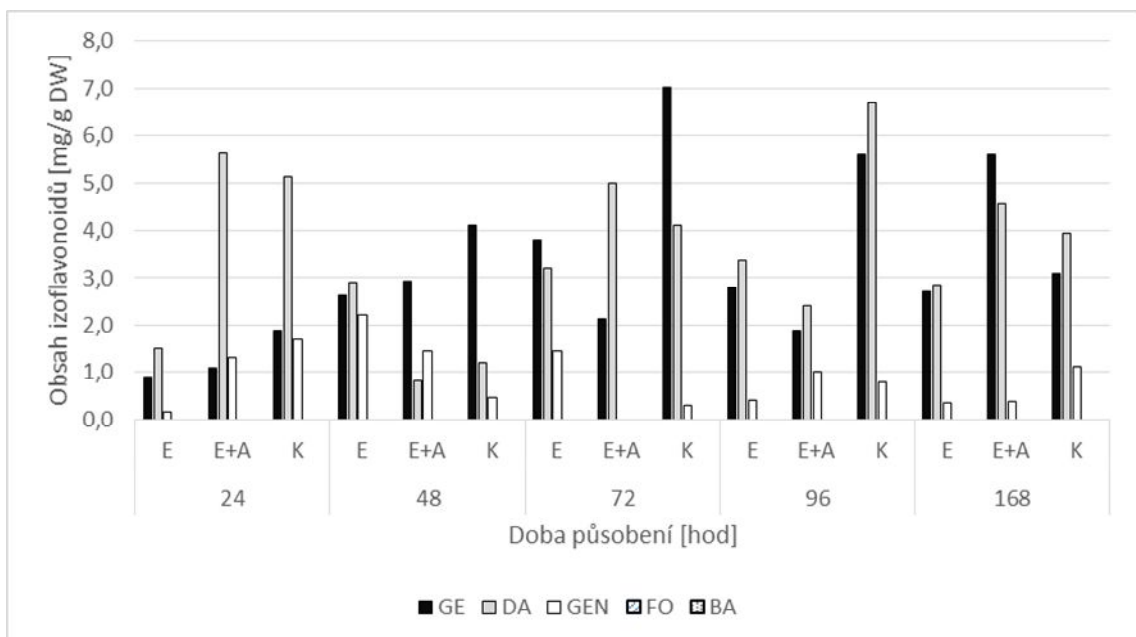
Graf 4: Vylučování izoflavonoidů do média kalusové kultury po aplikaci elicitorů
v koncentraci 7000 μM



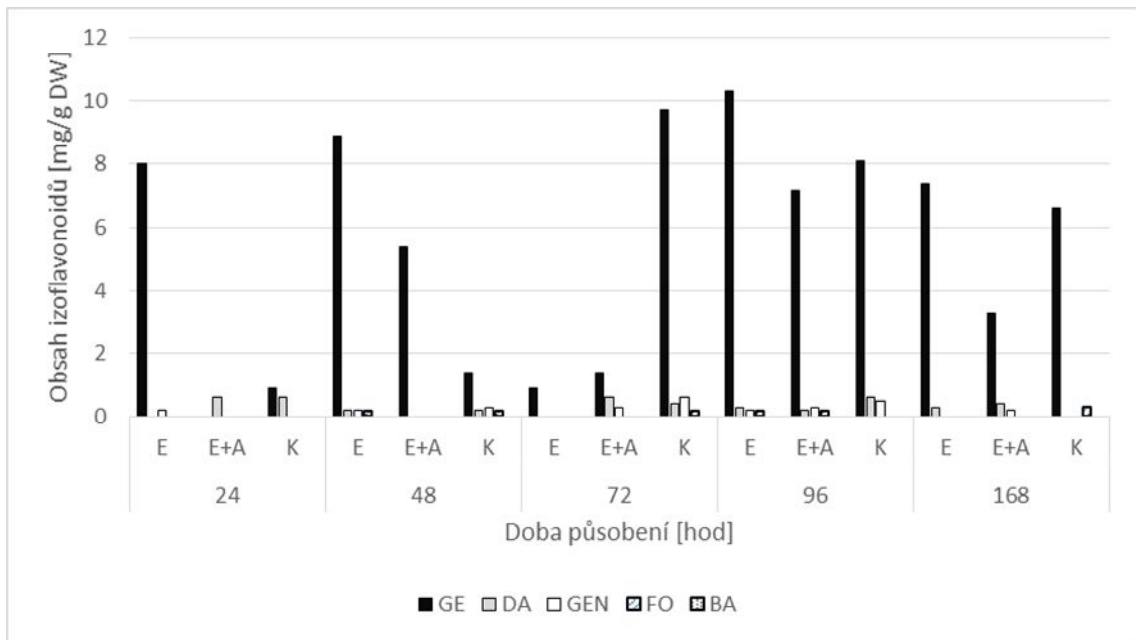
Graf 5: Vylučování izoflavonoidů do média kalusové kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 700 μM



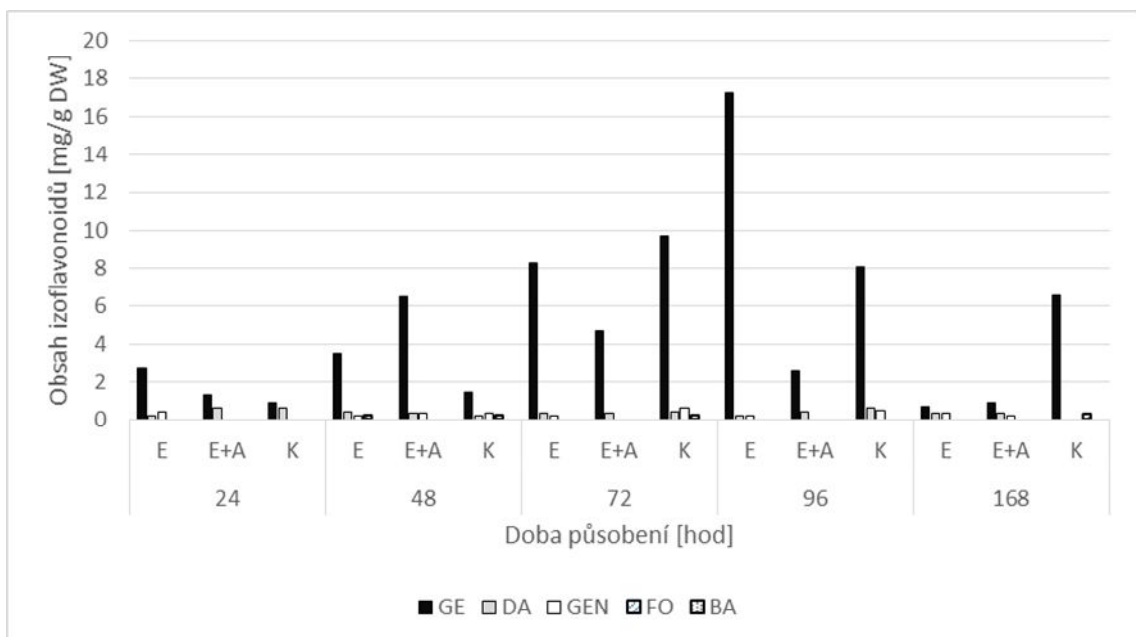
Graf 6: Vylučování izoflavonoidů do média kalusové kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 70 μM



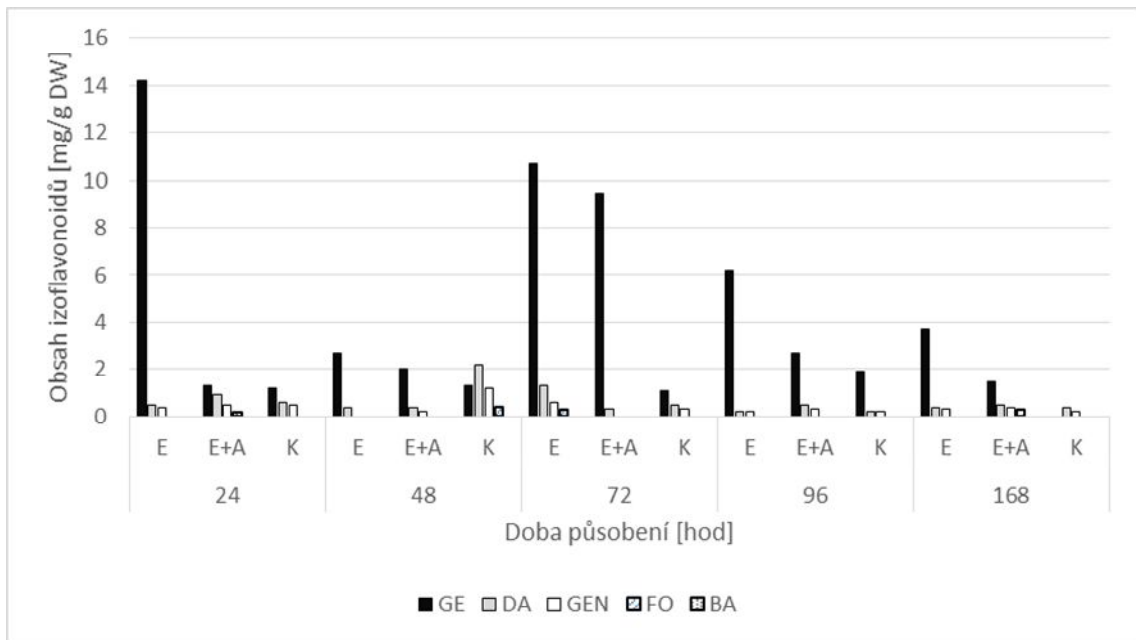
Graf 7: Produkce izoflavonoidů v suspenzní kultuře po aplikaci elicitorů
v koncentraci 7000 μM



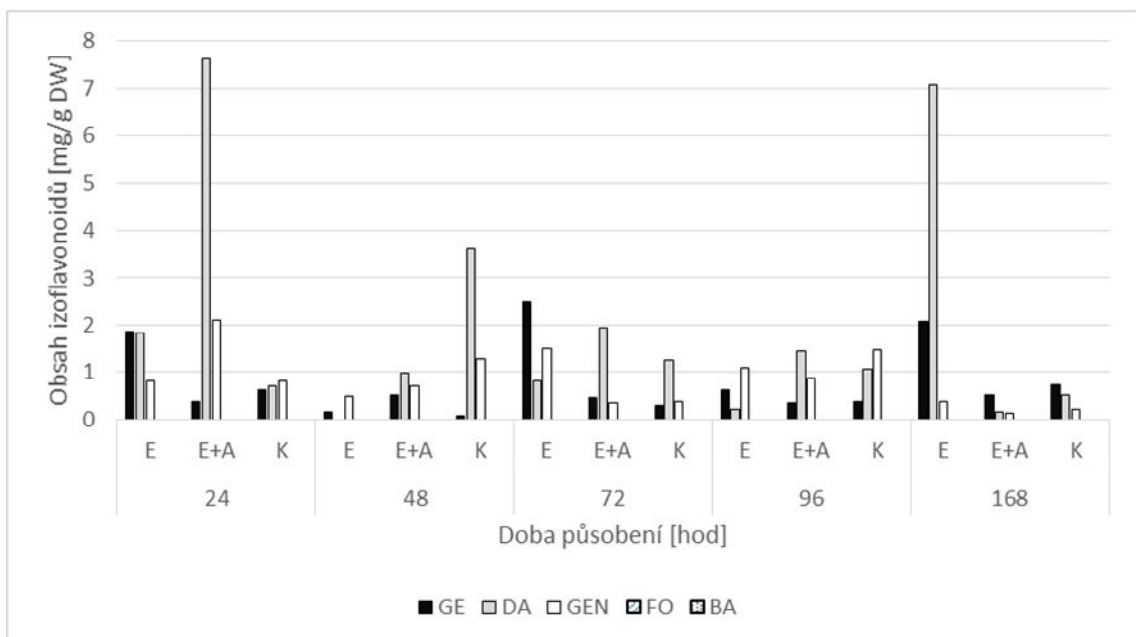
Graf 8: Produkce izoflavonoidů v suspenzní kultuře po aplikaci elicitorů
v koncentraci 700 μM



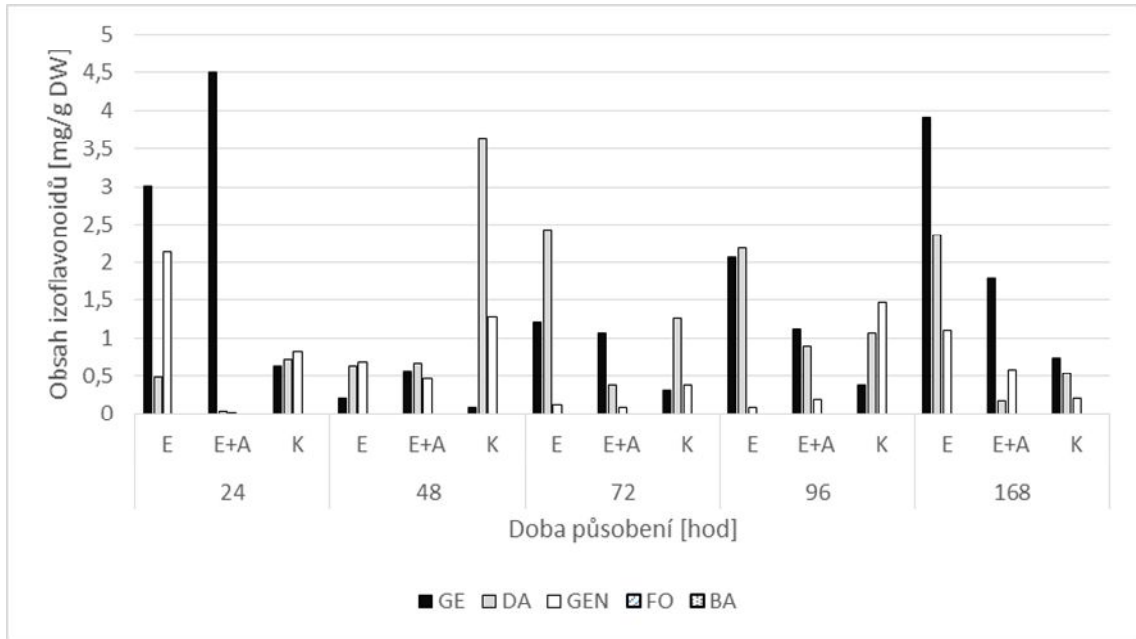
Graf 9: Produkce izoflavonoidů v suspenzní kultuře po aplikaci elicitorů
v koncentraci 70 μM



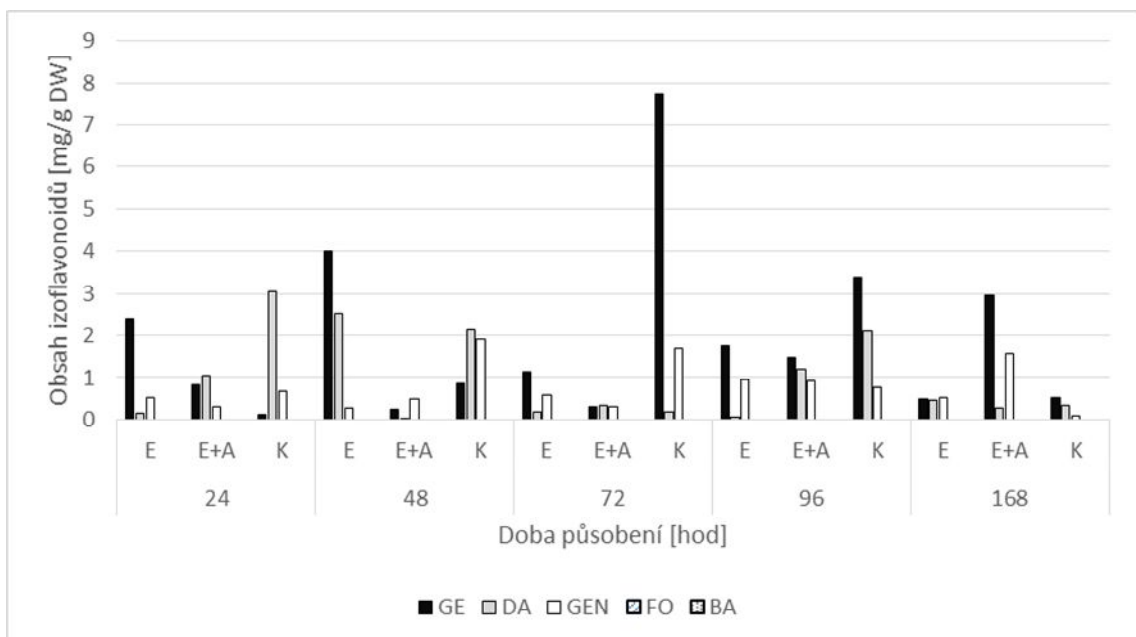
Graf 10: Vylučování izoflavonoidů do média suspenzní kultury po aplikaci elicitorů
v koncentraci 7000 μM



Graf 11: Vylučování izoflavonoidů do média suspenzní kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 700 μM



Graf 12: Vylučování izoflavonoidů do média suspenzní kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 70 μM



5. DISKUZE

Tato práce se zaměřuje na sledování produkce izoflavonoidů v *in vitro* kultuře *Genista tinctoria* s využitím metody elicitace, která by mohla tuto produkci zvýšit.

Jako elicitor byl použit ethephon ve třech koncentracích (7000 μM , 700 μM , 70 μM). Jako inhibitor ethephonu byl použit AgNO_3 v koncentraci 120 μM .

Obsah izoflavonoidů produkovaných v *in vitro* kulturách byl zjištěn pomocí metody HPLC. Odběry vzorků z kalusových či suspenzních kultur se prováděly v časových intervalech po 24, 48, 72, 96 a 168 hodinách od podání elicitoru a nebo jeho kombinace s inhibitorem. Analyzovala se i živná média kalusových a suspenzních kultur, aby se zjistilo, zdali dochází k vyplavování izoflavonoidů do těchto médií.

Kalusové kultury (viz tabulky 2, 3, 4; viz grafy 1, 2, 3)

Genistin byl v kalusové kultuře naměřen v nejvyšší hodnotě obsahu po aplikaci ethephonu a AgNO_3 v koncentraci C2 po 24 hodinách (18,60 mg/g DW), což dokazuje, že v tomto případě se inhibiční vliv AgNO_3 neprojevil. Statisticky významné zvýšení produkce genistinu měly kalusové kultury po ošetření ethephonem v koncentraci C2 a C3. Ethephon v koncentraci C1 produkci genistinu i snižoval, nejvíce po 48 hodinách. Statisticky velmi významně zvýšená produkce genistinu byla také pozorována v kalusové kultuře po aplikaci ethephonu v koncentraci C3 s AgNO_3 po 168 hodinách (AgNO_3 zde účinek ethephonu neinhiboval). Inhibiční vliv AgNO_3 na produkci ethephonu se projevil v kalusové kultuře ošetřené AgNO_3 s ethephonem v koncentraci C1 po 24 hodinách a v koncentraci C2 po 72, 96 a nejvíce po 48 hodinách.

Daidzein dosáhl nejvyšší hodnoty obsahu v kultuře ošetřené ethephonem v koncentraci C2 po 96 hodinách (45,10 mg/g DW). Statisticky nejvýznamnější nárůst produkce daidzeinu byl zaznamenán při aplikaci ethephonu v koncentraci C2 po 48, 72 a 96 hodinách, dále pak v koncentraci C1 po 48 hodinách. Statisticky významně také vzrostla produkce daidzeinu v kultuře ošetřené AgNO_3 s ethephonem v koncentraci C3 po 24 hodinách (AgNO_3 zde účinek ethephonu neinhiboval). Snížené hodnoty produkce daidzeinu byly zaznamenány po ošetření ethephonem v koncentraci C1 po 24 a 72 hodinách. AgNO_3 inhiboval účinek ethephonu na produkci daidzeinu nejvíce po

aplikaci kombinace s ethephonem v koncentraci C2 po 72 hodinách, dále v koncentraci C1 po 24 hodinách a v koncentraci C3 neměl vliv žádný.

Nejvyšší hodnota obsahu **genisteinu** byla naměřena v kalusové kultuře po aplikaci AgNO₃ s ethephonem v koncentraci C2 po 24 hodinách (8,10 mg/g DW). V tomto případě se opět inhibiční vliv AgNO₃ na účinek ethephonu neprojevil. Další statisticky významné zvýšení produkce genisteinu v kalusové kultuře bylo zaznamenáno ještě po aplikaci AgNO₃ s ethephonem v koncentraci C3 také po 24 hodinách, jinak byly hodnoty tvorby genisteinu v této koncentraci nulové. Opět zde můžeme pozorovat, že přítomnost AgNO₃ nemusí účinek ethephonu vždy ovlivnit.

Produkce **formononetinu** v kalusové kultuře byla jen statisticky mírně zvýšená po aplikaci ethephonu v koncentraci C1 po 168 hodinách a v koncentraci C2 po 48 a 72 hodinách. **Biochanin A** se kromě jedné hodnoty, která byla na hranici detekovatelnosti po ošetření kultury ethephonem v koncentraci C3 po 24 hodinách, v kalusové kultuře nevyskytoval.

Média kalusových kultur (viz tabulka 5, 6, 7; viz graf 4, 5, 6)

Do média kalusové kultury se vylučovaly genistin, daidzein a genistein.

V živném médiu bylo zaznamenáno statisticky významné uvolnění **genistinu** po ošetření kultury ethephonem v koncentraci C1 po 24 hodinách, v koncentraci C2 po 24 a 96 hodinách a nejvíce pak v koncentraci C3 po 168 hodinách, kde byl k ethephonu přidáván i AgNO₃ (zde se jeho inhibiční efekt neprojevil). Inhibiční vliv AgNO₃ na uvolnění genistinu do média byl pozorován ve všech použitých koncentracích ethephonu, kromě koncentrace C3 po 24, 48, 96 a 168 hodinách.

Uvolnění do média u **daidzeinu** dosáhlo nejvyšší hodnoty obsahu po ošetření kultury ethephonem v koncentraci C2 po 96 hodinách (9,8 mg/100 ml). Statisticky nejvýznamnější vyloučení daidzeninu do média bylo zaznamenáno po aplikaci AgNO₃ s ethephonem v koncentraci C1 po 168 hodinách, dále také po 72 hodinách (ani v těchto případech AgNO₃ účinek ethephonu neinhiboval). Dále byly zaznamenány statisticky významně uvolněné hodnoty daidzeinu do média po ošetření kultury ethephonem v koncentraci C1 po 24 hodinách v koncentraci C2 po 72 a 96 hodinách a v koncentraci

C3 po 48 hodinách. Inhibiční vliv AgNO_3 na vyplavení daidzeinu do média se projevil nejvíce po aplikaci jeho kombinace s ethephonem o koncentraci C2.

Genistein se nejvíce uvolnil do média po 168 hodinách od aplikace ethephonu o koncentraci C1 (4,60 mg/100 ml). Po 24 a 168 hodinách od aplikace ethephonu o koncentraci C1, dále po 48 a 72 hodinách od aplikace ethephonu o koncentraci C3 byly zaznamenány statisticky významně zvýšené hodnoty genisteinu vyplaveného do média. V případě ošetření kultury ethephonem o koncentraci C2 bylo vyplavení genisteinu do média i snižováno. Při použití kombinace AgNO_3 s ethephonem v koncentraci C1 (ve všech časových intervalech kromě 48. hodiny), C2 a také C3 (jen po 48, 72 hodinách) byl zaznamenán inhibiční vliv AgNO_3 na uvolnění genisteinu do média.

Suspenzní kultury (viz tabulka 8, 9, 10; viz graf 7, 8, 9)

Nejvyšší naměřená hodnota obsahu **genistinu** v suspenzní kultuře byla zjištěna po aplikaci ethephonu v koncentraci C2 po 96 hodinách (17 mg/g DW). Statisticky nejvýznamnější zvýšení produkce genistinu oproti kontrolním vzorkům bylo zaznamenáno po aplikaci ethephonu v koncentraci C3 po 24 hodinách. Tato koncentrace ethephonu také statisticky významně zvyšovala produkci genistinu po 48, 72, 96 i 168 hodinách. Statisticky významně zvýšených hodnot obsahu genistinu bylo dosaženo také aplikací ethephonu o koncentraci C1 po 24, 48 a 96 hodinách a také o koncentraci C2 po 24, 48 a 96 hodinách. V suspenzní kultuře byl pozorován inhibiční vliv AgNO_3 u všech kombinací s ethephonem ve všech jeho použitých koncentracích a ve všech časových intervalech, kromě koncentrace ethephonu C2 po 48 hodinách.

Obsah **daidzeinu** v suspenzní kultuře dosahoval celkově nízkých hodnot a ani s použitím ethephonu se jeho obsah příliš nezvyšoval. K mírnému zvýšení produkce daidzeinu došlo po 72 hodinách od ošetření kultury ethephonem v koncentraci C3 a v koncentraci C1 po 168 hodinách. V dalších případech byla produkce daidzeinu buď snížena, nebo nebyla ovlivněna. Statisticky nejvýznamnější inhibiční vliv AgNO_3 byl zaznamenán po jeho aplikaci do kultury spolu s ethephonem o koncentraci C3 po 72 hodinách.

Také produkce **genisteinu** byla v suspenzní kultuře nízká. Mírně byla zvýšena po aplikaci ethephonu o koncentraci C2 po 24 hodinách a 168 hodinách a také o koncentraci C3 po 72 hodinách. V ostatních případech použití ethephonu buď nemělo na zvýšení produkce genisteinu vliv, nebo jeho obsah mírně snižovalo. K inhibičnímu vlivu AgNO_3 na produkci genisteinu došlo statisticky nejvýznamněji při jeho aplikaci s ethephonem v koncentraci C2 po 72 a 96 hodinách a v koncentraci C3 po 48 hodinách.

Formononetin byl v suspenzní kultuře produkován jen velmi málo. Statisticky významnější zvýšení produkce formononetinu bylo zaznamenáno po ošetření ethephonem pouze v koncentraci C3 po 72 hodinách.

Biochanin A nebyl v suspenzní kultuře zaznamenán.

Média suspenzních kultur (viz tabulka 11, 12, 13; viz graf 10, 11, 12)

Do média suspenzní kultury se vylučovaly genistin, daidzein a genistein.

Statisticky nejvýznamněji se **genistin** uvolňoval do média suspenzní kultury ošetřené ethephonem v koncentraci C2 v kombinaci s AgNO_3 po 24 hodinách. Také po 168 hodinách od aplikace této kombinace AgNO_3 s ethephonem o koncentraci C3 došlo ke statisticky významnému uvolnění genistinu do média. V obou těchto případech nepůsobil AgNO_3 na ethephon svým inhibičním účinkem. Další statisticky významné uvolnění genistinu bylo zaznamenáno v médiu suspenzní kultury ošetřené ethephonem v koncentraci C1 po 24, 72 a 168 hodinách, dále pak v koncentraci C2 po 96 a 168 hodinách a také v koncentraci C3 po 24 a 48 hodinách. Vyplavování genistinu do média inhiboval AgNO_3 u suspenzní kultury ošetřené ethephonem v koncentraci C1 po 24, 72, 96 a 168 hodinách, dále v koncentraci C2 po 72, 96 a 168 hodinách a také v koncentraci C3 po 24, 48, 96, nejvíce po 72 hodinách.

Statisticky nejvýznamnější uvolnění **daidzeinu** bylo zaznamenáno u média kultury ošetřené ethephonem o koncentraci C1 v kombinaci s AgNO_3 po 24 hodinách (inhibiční vliv AgNO_3 se zde neprojevil). Další statisticky významné vyplavení daidzeinu bylo pozorováno po aplikaci ethephonu v těžké koncentraci po 168 hodinách a dále také po aplikaci ethephonu v koncentraci C2 po 72, 96 a 168 hodinách. Statisticky nejvýznamnější snížení uvolněného daidzeinu do média bylo zaznamenáno po aplikaci

ethephonu v koncentraci C1 po 48 hodinách. Statisticky nejvýznamnější inhibiční vliv AgNO_3 byl zaznamenán v médiu suspenzní kultury ošetřené kombinací AgNO_3 s ethephonem v koncentraci C1 po 168 hodinách.

Statisticky nejvýznamněji byl **genistein** uvolněn do média suspenzní kultury po aplikaci ethephonu v koncentraci C3 spolu s AgNO_3 po 168 hodinách (inhibiční vliv se neprojevil). Další statisticky významně zvýšené uvolnění genisteinu bylo zaznamenáno v médiu kultury po aplikaci ethephonu v koncentraci C1 po 72 hodinách a po 24 hodinách v kombinaci s AgNO_3 (opět se inhibiční vliv neprojevil) a také v koncentraci ethephonu C2 po 24 hodinách. Statisticky nejvýznamnější inhibiční vliv AgNO_3 v případě genisteinu byl zaznamenán v médiu kultury ošetřené AgNO_3 s ethephonem v koncentraci C2 po 24 hodinách.

Jako elicitor si ethephon (150 mg/l) vybrali i Suang a Huang, kteří ve své studii sledovali inhibiční vliv ethephonu na obsah sušiny a obsah sekundárního metabolitu L-DOPY v kultuře rostliny *Stizolobium hassjoo*. I zde byl použit k inhibici ethephonu dusičnan stříbrný (1,5 mg/l), což se projevilo zvýšeným obsahem sušiny a produkcí sekundárního metabolitu L-DOPY. Bylo také zjištěno, že ethephon v koncentraci 150 mg/l měl za následek mnohem větší pokles obsahu sušiny, než při použití jeho nižších koncentrací 50 nebo 100 mg/l. ³⁶

V jiné studii se sledoval vliv ethephonu (8 $\mu\text{g}/40$ ml, 16 $\mu\text{g}/40$ ml, 24 $\mu\text{g}/40$ ml, 32 $\mu\text{g}/40$ ml, 40 $\mu\text{g}/40$ ml) a vliv AgNO_3 (10, 20, 30, 40 a 50 μM) na tvorbu kořenů v *in vitro* kultuře rostliny *Decalepis hamiltonii*. Bez použití elicitorů trvalo zakořenění minimálně 25 dní a kořeny byly zakrnělé. Stav zlepšil přidaný AgNO_3 , jehož podpůrný efekt na zakořenění mohl být důsledkem inhibice účinku ethylenu. Po přidání ethephonu došlo k nadměrné tvorbě kalusů u všech ošetřených vzorků. Sledoval se také vliv kombinace ethephonu s AgNO_3 . Výsledky studie ukázaly vliv vyšších koncentrací AgNO_3 na rychlost zakořenění, která se zkrátila až na 10 dní, dále pozitivní vliv ethephonu na tvorbu kalusu a také pozitivní ovlivnění účinků ethephonu v kombinaci s AgNO_3 na proliferaci kořenů. ⁴⁴

Další studie se zabývala vlivem ethephonu a stříbrných iontů na produkci izoflavonoidů v *in vitro* kultuře bobovité liány *Pueraria tuberosa*. V této studii byla použita stejná koncentrace AgNO_3 jako v této práci (120 μM) a také zde byly stejné

časové intervaly odběrů vzorků (po 24, 48, 72, 96 a 168 hodinách). Byl zde zjištěn 14 násobný nárůst obsahu izoflavonoidů (puerarin, genistin, daidzein, genistein) v suspenzní kultuře po ošetření ethephonem v koncentraci 100 μM po 48 hodinách. Tento efekt zcela inhiboval AgNO_3 .⁴⁰

Při porovnání výsledků studie s výsledky této práce lze potvrdit podobnost účinku ethephonu v koncentraci 70 μM po jeho aplikaci do suspenzní kultury, kde došlo po 24 hodinách ke statisticky významně zvýšené produkci genistinu a také v tomto případě tento efekt inhiboval AgNO_3 .

Vliv ethephonu (500, 400, 200, 100 a 50 μM) a jeho kombinace s AgNO_3 (120 μM) na produkci taxifolinu a flavolignanů byl studován také u kalusových a suspenzních kultur rostliny *Silybum marianum*. Sledovalo se také uvolnění těchto látek do živného média suspenzní kultury. Bylo prokázáno, že ethephon významně ovlivnil produkci jen některých složek silymarinového komplexu (silychristinu, silydianinu a silybinu A) a ty byly vyplavovány zejména do média suspenzních kultur.⁴⁹

Toto zjištění se potvrdilo i v této práci, v případě ovlivnění produkce izoflavonoidů a jejich vylučování do média suspenzních kultur rostliny *Genista tinctoria*.

6. ZÁVĚR

V této práci byl sledován vliv elicitoru ethephonu a kombinace s jeho inhibitorem dusičnanem stříbrným na produkci izoflavonoidů v kalusových a suspenzních kulturách rostliny *Genista tinctoria*.

In vitro kultura produkuje tyto sekundární metabolity: genistin, daidzein, genistein, formononetin a biochanin A.

Nejvýznamnější zvýšení produkce izoflavonoidů (hlavně daidzeinu, genistinu a genisteinu) v kalusových kulturách bylo docíleno aplikací ethephonu v koncentraci C2, o něco méně v koncentraci C3 a v jeho koncentraci C1 produkce izoflavonoidů v kulturách klesala nebo nebyla ovlivněna.

Nejvýznamnější zvýšení produkce izoflavonoidů (jen genistinu) v suspenzních kulturách bylo docíleno aplikací ethephonu v koncentraci C3, o něco méně v koncentraci C2, nejmenší vliv měl ethephon v koncentraci C1.

Nejvyšší produkce ze všech izoflavonoidů dosáhl daidzein v kalusové kultuře po ošetření ethephonem o koncentraci C2 po 96 hodinách (45,10 mg/g sušiny).

Nejvíce statisticky významný pokles produkce izoflavonoidů byl zaznamenán u daidzeinu v kalusové kultuře po 72 hodinách od aplikace ethephonu o koncentraci C1.

Inhibiční vliv AgNO_3 na účinky ethephonu se nejvíce projevil v obsahu daidzeinu v kalusové kultuře po aplikaci AgNO_3 s ethephonem o koncentraci C2.

Bylo prokázáno vylučování daidzeinu, genistinu a genisteinu do média kalusové kultury. Statisticky nejvýznamnější bylo uvolnění daidzeinu do média kalusové kultury po 168 hodinách od aplikace ethephonu v koncentraci C1 s AgNO_3 . Inhibiční vliv AgNO_3 zde tedy nehrál roli.

Prokázalo se také vylučování genistinu, daidzeinu a genisteinu do médií suspenzních kultur. Statisticky nejvýznamnější bylo uvolnění daidzeinu do média suspenzní kultury po 24 hodinách od aplikace ethephonu v koncentraci C1 s AgNO_3 . Inhibiční vliv AgNO_3 zde opět nehrál roli.

Při srovnání produkce izoflavonoidů v suspenzních a kalusových kulturách vykazují vyšší výtěžnost kultury kalusové.

Nejméně zastoupeny byly izoflavonoidy formononetin, který byl nalezen v suspenzních i kalusových kulturách pouze v hodnotách na hranici detekovatelnosti a biochanin A, který měl převážně nulové hodnoty, které nezvýšila ani aplikace ethephonu. Formononetin ani biochanin A se do živných médií neuvolňovaly.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Luczkiewicz M., Glód D.** Callus cultures of *Genista* plants – *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Science*, 2003, 165 (5), 1101 – 1108.
2. **Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A.** Elicitation and permeabilisation affect the accumulation and storage profile of phytoestrogens in high productive suspension cultures of *Genista tinctoria*. *Acta Physiol Plant*, 2012, 34, 1 - 16.
3. **Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A.** Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. *Plant Science* 2005, 169, 862 - 871.
4. **Jahodář L.** Farmakobotanika – Semenné rostliny. Karolinum, 2012, 115 - 119.
5. **Janča J., Zentrich J. A.** Herbář léčivých rostlin, 2. díl. Eminent, 1995, 264 - 267.
6. **Korbelář J., Endris Z.** Naše rostliny v lékařství. Avicenum, 1981, 216.
7. **Hanganu D., Olah N. K., Benedec D., Mocan A., Crisan G., Vlase L., Popica I., Oniga I.** Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genista tinctoria* L. and *Genistella sagittalis* (L.) Gams (*Fabaceae*). *Pak J Pharm Sci.*, 2016, 29 (1), 301 - 307.
8. **Opletal L., Koula V.** Daidalea Verze 1.0 ©. 2005. [cit. 2016-07-14]
<http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10103N>
9. **Houska J.** Botany. 2007. [cit. 2016-07-14]
<http://botany.cz/sc/Genista-tinctoria>
10. **Opletal L., Šimerda B.** Rostliny s antinutričními a toxickými látkami vyskytující se potenciálně v pícech v ČR: Kručinka barvířská. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha-Uhřetěves, 2012. [cit. 2016-01-14]
http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Metodika%20toxick%C3%BDch%20rostlin%202012_120327.pdf

11. **Tůmová L., Tůma J.** The effect of UV light on isoflavonoid production in *Genista tinctoria* culture *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33 (2), 635 - 640.
12. **Hubík J., Dušek J., Spilková J., Šícha J.** Obecná farmakognozie II. - Sekundární látky. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1989, 31 – 33.
13. **Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.** Farmakognozie. Karolinum, 2016, 102 - 103, 119 - 120.
14. **Spagnuolo C., Russo G. L., Orhan I. E., Habtemariam S., Dagli M., Sureda A., Nabavi S. F., Devi K. P., Loizzo M. R., Tundis R., Nabavi S. M.** Genistein and cancer: current status, challenges and future directions. *Adv Nutr.* 2015, 6 (4), 408 – 419.
15. **Nagy M., Mučaji P., Grančai D.** Farmakognózia – Biologicky aktívne rastlinné metabolity a ich zdroje. *Herba*, 2015, 26, 32 - 33, 48, 125.
16. **Tůmová L., Tůma J.** Dyer's Greenweed (*Genista tinctoria* L.): Constituents and biological activity [Kručinka barvířská (*Genista tinctoria* L.) – Obsahové látky a biologická aktivita]. *Čes. slov. Farm.* 2011, 60 (2), 61 - 64.
17. **Vladimirova I. N., Georgiyants V. A.** Lipophilic substances from *Genista tinctoria*. *Chem Nat Compd*, 2013, 49, 91 - 92.
18. **Tomko J. a kol.** Farmakognózia. Osveta, 1999, 339.
19. **Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A., Glod D.** Plant growth regulators affect biosynthesis and accumulation profile of isoflavone phytoestrogens in high-productive *in vitro* cultures of *Genista tinctoria*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2014, 118, 419 – 429.
20. **Wink M.** Quinolizidine alkaloids: Biochemistry, metabolism and function in plants and cell suspension cultures. *Planta Med*, 1987, 53 (6), 509 - 514.
21. **Kováč J.** Explantátové kultury rostlin. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, fakulta pedagogická, 1995, 1 - 3, 8 - 10, 13 - 18.
22. **Novák F. J.** Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. *Academica Praha*, 1990, 13, 26 - 27.

23. **Sikyta B., Dušek J.** Biotechnologie pro farmaceuty. Karolinum, 2001, 75, 78 - 82.
24. **Procházka S., Šebánek J.** Regulátory rostlinného růstu. Academica Praha, 1997, 17 - 19, 92 - 101, 147 - 153.
25. **Jahodář L.** Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty. Karolinum, 2000, 31, 36 - 41.
26. **Srinibas K.** Callus Culture: History, principles and significance. Biology discussion. 2013. [cit. 2016-07-18]
<http://www.biologydiscussion.com/plant-tissues/callus-culture/callus-culture-history-principles-and-significance-plant-tissue-culture/14597>
27. **Dubová J., Smíšková A.** Od rostlinné kultury „*in vitro*“ k biotechnologiím. [cit. 2016-07-18] <https://educoland.muni.cz/down-50/>
28. **Šetlík I., Seidlová F., Šantrůček J.** Fyziologie rostlin. Kap. 2. Regulace růstu. 23. [cit. 2016-07-24]
<http://web.natur.cuni/biochem/kucera/rostliny/is/kap02.pdf>
29. **Patel H., Krishnamurthy R.** Elicitors in plant tissue culture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2013, 2 (2), 60 - 65.
30. **Pubchem.** Open chemistry database. Ethephon. [cit. 2016-07-23]
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2782>
31. **Modern insecticides limited.** Ethephon. [cit. 2016-07-24]
http://milindia.co.in/ethephon_gibberellic93.html
32. **Extension Toxicology Network.** Pesticide information profiles. [cit. 2016-07-17] <http://extoxnet.orst.edu/pips/ethephon.htm>
33. **Linden J. C., Haigh J. R., Mirjalili N., Phisaphalong M.** Gas concentration effects on secondary metabolite production by plant cell cultures. Adv Biochem Eng/Biotech 2001, 72, 27 - 62.

34. **Qifang P., Yu Ch., Quan W., Fang Y., Shihai X., Yuesheng T., Jingya Z., Xiaofen S., Kexuan T.** Effect of plant growth regulators on the biosynthesis of vinblastine, vindoline and catharanthine in *Catharanthus roseus*. *Plant Growth Regulation*. 2010, 60 (2), 133 - 141.
35. **Hakimeh M., Fatemeh S., Zahra A., Fatemeh N.** Effects of ethephon on terpenoids in *Cannabis sativa* L. in vegetative stage. *Journal of Essential oil bearing plants*, 2016, 19 (1), 94 - 102.
36. **Sung L. S., Huang S. Y.** Headspace ethylene accumulation on *Stizolobium hassjoo* hairy root culture producing L-3,4-dihydroxyphenylalanine. *Biotechnol Lett*, 2000, 22, 875 - 878.
37. **Uchanski M. E., Blalock A.** Ethephon improved pigmentation but had no effect on *Cayenne pepper* fruit yield in southern New Mexico, *Hort Science*, 2013, 48 (6), 738 - 741.
38. **Helyes L., Lugasi A., Schober G. Y., Pek Z.** Effect of ethrel on ripening dynamic and lycopene content in case of two processing varieties, *Acta horticulturae*, 2007, 758, 275 - 280.
39. **Wang Y. Y., Li B. Q., Qin G. Z., Li L., Tian S. P.** Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. *Scientia Horticulturae*, 2011, 129 (2), 183 - 188.
40. **Shaily Goyal S., Ramawat K. G.** Etherel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2008, 30, 849.
41. **Liu M. Y., Song C. Z., Chi M., Wang T. M., Zuo L. L., Li X. L., Zhang Z. W., Xi Z. M.** The effects of light and ethylene and their interaction on the regulation of proanthocyanidin and anthocyanin synthesis in the skins of *Vitis vinifera*. *Plant growth regulation*, 2016, 79 (3), 377 - 390.

42. **Křížková S., Adam V., Kizek R.** Fytotoxicita stříbrných iontů. Chem. Listy 2009, 103, 559 - 568.
43. **Hsieh M. Ch., Graham T. L.** Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugate. Phytochemistry. 2001, 58 (7), 995 - 1005.
44. **Bais H. P., Sudha G., Suresh B., Ravishankar G. A.** Silver nitrate influences *in vitro* root formation in *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn. Current science, 2000, 79 (6), 894 - 898.
45. **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bio assay with *Tobacco* tissue culture. Physiol Plant. 1962, 15 (3), 473 - 497.
46. **Klimeš J. a kol.** Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2015, 245.
47. **Reisenauer R.** Metody matematické statistiky a jejich aplikace. SNTL, 1970, 79 - 81.
48. **Klemera P., Klemerová V.** Základy aplikované statistiky pro studující farmacie. Karolinum, 1997, 23 - 27.
49. **Cinková L.** Kultury léčivých rostlin *in vitro*-XVII. Farmaceutická fakulta v HK, diplomová práce, 2015.

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Celá rostlina ⁵

Obrázek 2: Květenství ⁸

Obrázek 3: Chemické struktury estradiolu, genisteinu, daidzeinu, genistinu, formononetinu a biochaninu A ^{14,16}

Obrázek 4: Strukturní vzorce flavanu, izoflavanu a neoflavanu ¹²

Obrázek 5: Odvození Explantátové kultury z rostliny ²³

Obrázek 6: Chemický vzorec ethylenu ²⁸

Obrázek 7: Chemická struktura ethephonu ³¹

Obrázek 8: Kalibrační křivka genistinu

Obrázek 9: Kalibrační křivka daidzeinu

Obrázek 10: Kalibrační křivka genisteinu

Obrázek 11: Kalibrační křivka formononetinu

Obrázek 12: Kalibrační křivka biochaninu A

Obrázek 13: Chromatogram standardů

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled počtu baněk pro daný časový interval

Tabulka 2: Koncentrace C1 – 7000 μM

Tabulka 3: Koncentrace C2 – 700 μM

Tabulka 4: Koncentrace C3 – 70 μM

Tabulka 5: Koncentrace C1 – 7000 μM

Tabulka 6: Koncentrace C2 – 700 μM

Tabulka 7: Koncentrace C3 – 70 μM

Tabulka 8: Koncentrace C1 – 7000 μM

Tabulka 9: Koncentrace C2 – 700 μM

Tabulka 10: Koncentrace C3 – 70 μM

Tabulka 11: Koncentrace C1 – 7000 μM

Tabulka 12: Koncentrace C2 – 700 μM

Tabulka 13: Koncentrace C3 – 70 μM

10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Produkce izoflavonoidů v kalusové kultuře po aplikaci elicitorů v koncentraci 7000 μM

Graf 2: Produkce izoflavonoidů v kalusové kultuře po aplikaci elicitorů v koncentraci 700 μM

Graf 3: Produkce izoflavonoidů v kalusové kultuře po aplikaci elicitorů v koncentraci 70 μM

Graf 4: Vylučování izoflavonoidů do média kalusové kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 7000 μM

Graf 5: Vylučování izoflavonoidů do média kalusové kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 700 μM

Graf 6: Vylučování izoflavonoidů do média kalusové kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 70 μM

Graf 7: Produkce izoflavonoidů v suspenzní kultuře po aplikaci elicitorů v koncentraci 7000 μM

Graf 8: Produkce izoflavonoidů v suspenzní kultuře po aplikaci elicitorů v koncentraci 700 μM

Graf 9: Produkce izoflavonoidů v suspenzní kultuře po aplikaci elicitorů v koncentraci 70 μM

Graf 10: Vylučování izoflavonoidů do média suspenzní kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 7000 μM

Graf 11: Vylučování izoflavonoidů do média suspenzní kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 700 μM

Graf 12: Vylučování izoflavonoidů do média suspenzní kultury po aplikaci elicitorů v koncentraci 70 μM